

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PSEUDOMONAS SPP. EM RÉPTEIS DE COMPANHIA: UM ESTUDO RETROSPETIVO

HELENA MARGARIDA CARVALHO MIRANDA AUGUSTO ROQUE

ORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



PSEUDOMONAS SPP. EM RÉPTEIS DE COMPANHIA: UM ESTUDO RETROSPETIVO

HELENA MARGARIDA CARVALHO MIRANDA AUGUSTO ROQUE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de Sousa
Jesus

ORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Helena Margarida Carvalho Miranda Augusto Roque

Título da Tese ou Dissertação: *Pseudomonas* spp. em répteis de companhia: um estudo retrospectivo

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de
Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, n^o máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 24 de Fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Helena A. Roque

Para o meu eterno amigo e colega de curso, Diogo Faria

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Professora Manuela Oliveira, pelo apoio e disponibilidade incansáveis na realização deste trabalho. Sempre dedicada e divertida, um exemplo!

A todos os clínicos, por receberem e acompanharem estes animais ao longo dos anos. Ao Professor António Ferreira, por permitir o acesso à plataforma do Hospital Escolar Veterinário. À D. Anita, pela ajuda indispensável na pesquisa e recolha das fichas clínicas dos répteis incluídos no estudo.

A toda a equipa da CVC e LMI, por me acompanharem durante o período de estágio e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos meus pais, a minha força motriz e inspiração desde que me reconheço enquanto pessoa. É tão bom poder voar, sabendo que tenho um porto seguro para o qual posso sempre regressar: vocês.

À minha irmã Nani, a tranquilidade no meio do caos e a bondade em pessoa. À minha irmã Joana, o sinónimo de força e o meu espelho em tantas características. Crescer foi, sem dúvida, melhor com as nossas brincadeiras e companheirismo.

Ao meu namorado Cristiano, pelo incentivo, companhia diária e, principalmente, pela capacidade de me pôr sempre um sorriso na cara. Tornaste todo este processo mais leve e divertido. A minha vida também.

Aos meus avós maternos, Mimi e Eurico, pelo amor e carinho demonstrados de tantas formas. Avó Mimi, os teus ataques de riso não são esquecidos.

Aos meus avós paternos, Adélia e Vitorino, por todas os conselhos e tardes passadas em frente à máquina de costura.

Aos meus sobrinhos, Henrique, Helena, Lourenço, Alice e Lucas, por trazerem uma felicidade e energia sem igual à nossa família.

À minha amiga Mariana, companheira de uma vida, por ser determinante na pessoa que sou hoje e por partilhar comigo esta paixão infindável pelos animais.

Ao meu amigo Diogo, a pessoa mais feliz que já conheci, por todas as aventuras e pelos ensinamentos que, mesmo ausente, me soube transmitir. Gostava que também tivesses a oportunidade de terminar esta etapa. E viver outras tantas. Fazes falta!

Aos meus grandes amigos de faculdade, Joana, Marta, João Vasco, Miguel, Duda, Benny, Chicão, Nasci, Érica e Bettencourt, porque este percurso não teria sido tão incrível sem eles. Serão sempre os meus ZP.

À Sofia, por todas as memórias e loucuras. À Raquel, por todos os sorrisos e doçura constante. As melhores companheiras de Erasmus, um ano inesquecível.

A todas as pessoas e animais que me ajudaram nesta montanha-russa que é a Veterinária.

PSEUDOMONAS SPP. EM RÉPTEIS DE COMPANHIA: UM ESTUDO RETROSPETIVO

RESUMO

A manutenção de répteis como animais de companhia tem aumentado nos últimos anos na Europa. Estes animais podem ser reservatórios de microrganismos zoonóticos, incluindo bactérias do género *Pseudomonas*, cujos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em constante evolução tornam as opções terapêuticas disponíveis atualmente cada vez mais ineficazes, pelo que a monitorização da relação entre este género bacteriano e a classe Reptilia é de grande importância.

Este estudo retrospectivo teve como objetivos o cálculo da frequência de isolamento de *Pseudomonas* em répteis detidos como animais de companhia ou de coleção, apresentados a consulta no Hospital Escolar Veterinário (HEV) entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2020; a identificação de fatores que podem predispor para infeção por *Pseudomonas* spp. em répteis; e a caracterização do perfil de resistência a antibióticos, através do método de difusão em disco (Kirby-Bauer), dos isolados. Para tal, procedeu-se à verificação dos relatórios de análises bacteriológicas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LMI) da FMV-ULisboa e procedeu-se à pesquisa e recolha das fichas clínicas dos répteis através da plataforma Gurusvet®, tendo sido possível ter acesso às fichas de 24 animais, cujos dados foram utilizados para análise estatística.

Verificou-se uma frequência de isolamento para *Pseudomonas* spp. de 35%. Não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o isolamento deste género bacteriano e a idade, género ou espécie dos répteis, nem com o tipo de doença apresentado pelos animais. No entanto, os perfis de multirresistência obtidos são preocupantes, com 4 isolados classificados como multirresistentes, 4 classificados como extensivamente resistentes e 1 classificado como pan-resistente. Estes resultados alertam para a imprescindibilidade da criação de uma política de administração de antibióticos em répteis, com uma hierarquização dos agentes, de forma a garantir uma prescrição segura e universal.

A eficácia do tratamento de uma infeção cutânea grave causada por *Pseudomonas* sp., não suscetível a todos os antibióticos utilizados, através da aplicação de um antisséptico tópico, pode sugerir que esta abordagem seja válida noutros casos clínicos e uma opção adequada para tratamento empírico enquanto se aguarda pelos resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos ou do cálculo da concentração mínima inibitória.

Palavras-chave: *Pseudomonas*; Répteis; Virulência; Resistência a antimicrobianos; Saúde Pública.

PSEUDOMONAS SPP. IN COMPANION REPTILES: A RETROSPECTIVE STUDY

ABSTRACT

The maintenance of reptiles as pets has increased in recent years in Europe. These animals can be reservoirs of zoonotic microorganisms, including bacteria of the genus *Pseudomonas*, whose resistance mechanisms to antimicrobials in constant evolution make the therapeutic options available today increasingly ineffective, so monitoring the relationship between this bacterial genus and the Reptilia class is of great importance.

This retrospective study aimed to calculate the frequency of isolation of *Pseudomonas* in reptiles kept as pets, presented for consultation at the Veterinary Teaching Hospital (HEV) between April 2006 and February 2020; the identification of factors that may predispose to infection by *Pseudomonas* spp. in reptiles; and the characterization of the antibiotic resistance profile, using the disk diffusion method (Kirby-Bauer), of the isolates. To achieve this, we proceeded to the verification of the bacteriological analysis reports of the Microbiology and Immunology Laboratory (LMI) of FMV-ULisboa and proceeded to the research and collection of the clinical records of the reptiles through the Guruvet ® platform, having been able to access to the records of 24 animals, whose data were used for statistical analysis.

An isolation frequency for *Pseudomonas* spp. of 35% was obtained. There was no statistically significant association between the isolation of this bacterial genus and the age, genus or species of the reptiles, nor with the type of disease presented by the animals. However, the multi-resistance profiles obtained are worrying, with 4 isolates classified as multidrug-resistant, 4 classified as extensively drug resistant and 1 classified as pandrug-resistant. These results alert to the necessity of creating a policy of antibiotics' administration in reptiles, with a hierarchy of agents, in order to guarantee a safe and universal prescription.

The effectiveness of the treatment of a severe skin infection caused by *Pseudomonas* sp., not susceptible to all antibiotics used, through the application of a topical antiseptic may suggest that this approach is valid in other clinical cases and an appropriate option for empirical treatment pending the results of the antibiotic sensitivity test or the calculation of the minimum inhibitory concentration.

Keywords: *Pseudomonas*; Reptiles; Virulence; Antimicrobial resistance; Public Health.

ÍNDICE

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
CAPÍTULO I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. <i>Pseudomonadaceae</i>	3
1.1. Características gerais	3
1.2. Fatores de virulência e patogenicidade	5
1.3. Perfil de resistência a antimicrobianos.....	10
1.3.1. Resistência a β -Lactâmicos.....	12
1.3.2. Resistência a Fluoroquinolonas	13
1.3.3. Resistência a Aminoglicosídeos.....	14
1.3.4. Resistência a Antibióticos Policatiônicos	15
2. Características da infecção por <i>Pseudomonadaceae</i> em répteis.....	16
2.1. Características gerais dos répteis	16
2.2. Fontes de contaminação	17
2.3. Fatores condicionantes ao desenvolvimento de infecção.....	18
2.4. Sinais clínicos e Diagnóstico	20

2.5. Tratamento	21
2.6. Utilização de biocidas no tratamento de infeções por <i>Pseudomonas</i> spp. em répteis.....	23
2.7. Estratégias de prevenção	24
2.8. Importância de <i>Pseudomonas</i> spp. em répteis para a Saúde Pública.....	26
CAPÍTULO III – <i>Pseudomonas</i> spp. em répteis de companhia: um estudo retrospetivo	28
1. Introdução	28
2. Objetivos do estudo	28
3. Materiais e Métodos.....	28
3.1. Amostra em estudo	28
3.2. Recolha de dados.....	29
3.3. Isolamento e identificação de <i>Pseudomonas</i> spp.	29
3.4. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)	31
3.5. Análise estatística	31
CAPÍTULO IV – Resultados	32
1. Caracterização da amostra	32
2. Isolamento e identificação de <i>Pseudomonas</i> spp.....	33
2.1. Relação entre o isolamento de <i>Pseudomonas</i> e a idade, género e espécie dos répteis, e o tipo de doença diagnosticado	36
3. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA).....	37
4. Protocolos terapêuticos em répteis com diagnóstico de infeção por <i>Pseudomonas</i> spp.....	39
CAPÍTULO V – Discussão	43
1. Caracterização da amostra	43
2. Isolamento e identificação de <i>Pseudomonas</i> spp.....	45

3. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA).....	48
4. Protocolos terapêuticos em répteis com diagnóstico de infecção por <i>Pseudomonas</i> spp.....	51
5. Limitações do presente estudo retrospectivo transversal	53
CAPÍTULO VI – Conclusão	54
Bibliografia	55
Anexo I – Fluxograma criado pela FECAVA para auxiliar a tomada de decisão da presença de antibióticos no protocolo terapêutico	65
Anexo II – Descrição do exame físico dos 7 animais a partir dos quais foram obtidos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo do sistema de secreção tipo III (original da autora)	7
Figura 2- Fluxograma dos métodos bacteriológicos utilizados no LMI para identificação bacteriana	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Política de administração de antibióticos desenvolvida e aplicada no Serviço de Medicina Zoológica do Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Georgia.....	23
Tabela 2- Caracterização dos animais a partir dos quais foi isolada <i>Pseudomonas spp.</i>.....	35
Tabela 3- Resultados obtidos através de testes de regressão logística para avaliar a existência de associação entre o isolamento de <i>Pseudomonas spp.</i> e a idade, género e espécie dos répteis, e o tipo de doença diagnosticado; o nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$	36
Tabela 4- Caracterização dos resultados dos TSA obtidos para os diferentes isolados com <i>Pseudomonas spp.</i> e classificação dos respetivos perfis de multirresistência tendo em conta os distintos modos de ação dos antibióticos utilizados	38
Tabela 5- Esquematização dos protocolos terapêuticos aplicados, dos resultados dos TSA e da adaptação da terapia consoante estes resultados ao longo do tempo nos ID 4 e 5	42

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Prevalência dos diferentes tipos de doença diagnosticadas na amostra em estudo	33
Gráfico 2- Distribuição do isolamento de Pseudomonas spp. nas diferentes espécies incluídas no estudo	34
Gráfico 3- Frequência de isolamento das diferentes espécies de Pseudomonas identificadas na amostra em estudo	36
Gráfico 4- Distribuição dos diferentes protocolos de antibioterapia empírica aplicados em consulta.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC- Acetiltransferases de aminoglicosídeo
ADP- Adenosina difosfato
AG- Aminoglicosídeos
AI- Autoindutores
CAMV- Centro de Atendimento médico-veterinário
CCPD- Centros de Controlo e Prevenção de Doenças
CEPCD- Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças
CLSI- Clinical & Laboratory Standards Institute
CMI- Concentração Mínima Inibitória
DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EMA- Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
Exo S,T,U ou Y- Exoenzima S,T,U ou Y
FECAVA- Federation of European Companion Animal Veterinary Associations
FMV- Faculdade de Medicina Veterinária
FQ- Fluoroquinolonas
gyrA- Topoisomerase II
HEV- Hospital Escolar Veterinário
LAH- Lactona acil-homoserina
LPS- Lipopolissacarídeos
MR- Multirresistente
parC- Topoisomerase IV
PR- Pan-resistente
PVD- Pioverdina
QS- *Quorum sensing*
RNA- Ácido ribonucleico
SNA- Sistema Nervoso Autónomo
SPE- Substância polimérica extracelular
SST3- Sistema de Secreção Tipo III
TSA- Teste de sensibilidade aos antibióticos
XR- Extensivamente resistente
Zn²⁺- Iões de zinco

CAPÍTULO I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular referente ao Mestrado Integrado em Medicina Veterinária realizou-se em duas vertentes, a primeira na Clínica Veterinária do Crestelo (CVC), em Seia, sob a orientação do Dr. Miguel Miranda, diretor clínico, do Dr. Luís Barros e do Dr. Mário Martins; e a segunda no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LMI) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV), da Universidade de Lisboa.

O estágio na CVC fez um total de 220 horas. A prática clínica focou-se em animais de companhia e animais de produção, especialmente em ovinos, caprinos e suínos. A clínica não se encontra dividida por diferentes áreas médico-veterinárias, o que fez com que estas fossem abordadas diariamente de acordo com a casuística existente.

As atividades desenvolvidas em animais de companhia abrangeram as áreas de medicina interna, internamento, cirurgia, imagiologia e parasitologia. Em contexto de consulta, foi possível estar presente e auxiliar na recolha da história clínica do animal e realização de um exame físico completo, protocolos vacinais e de desparasitação, recolha de sangue, realização de hemograma e análises bioquímicas, paracentese abdominal, realização de testes rápidos de Leishmaniose e testes rápidos de FIV e FeLV, biópsia de massas, avaliação microscópica de amostras para pesquisa parasitológica, preparação e administração de medicação, contenção dos animais para realização de ecografia e radiografia, triagem de emergências e planeamento do protocolo terapêutico, formação dos tutores quanto aos cuidados necessários para a manutenção do bem-estar dos seus animais de estimação, entre outros. No internamento foi possível participar na discussão dos casos clínicos e colaborar em diversos atos médico-veterinários, tais como a aplicação de cateteres venosos, administração de fármacos pelas vias oral, subcutânea, intramuscular e endovenosa, adaptação da estratégia terapêutica consoante a evolução do estado clínico do animal, tratamento de lesões cutâneas e desbridamento de feridas. No âmbito cirúrgico, houve a possibilidade de preparar e administrar a medicação anestésica, realizar tricotomia e desinfecção do animal, monitorizar o plano anestésico e o estado do animal durante a cirurgia, auxiliar o cirurgião, entre outras atividades.

Na área de animais de produção, o trabalho desenvolvido focou-se principalmente na sanidade animal de caprinos e ovinos da Serra da Estrela, em parceria com a Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela (ANCOSE), com a realização de desparasitação, vacinação e marcação dos animais (colocação de brinco e chip), assim como a recolha de sangue para a pesquisa de brucelose. Para além disso, houve também a oportunidade de estar presente no diagnóstico e tratamento de diversas doenças do foro

gastrointestinal, respiratório e infeccioso em pequenos ruminantes e suínos. Em contexto cirúrgico, destaca-se a correção de uma atresia anal num borrego de 3 dias.

O estágio no LMI perfez um total de 260 horas. Foi possível acompanhar e participar na realização dos procedimentos diários levados a cabo pela equipa com o objetivo de diagnosticar diferentes processos infecciosos. Em bacteriologia, o foco principal do estágio, foi possível estar presente e auxiliar na recolha de amostras, propagação em 3 meios distintos, nomeadamente em meio de agar sangue, meio de MacConkey e meio BHI, para pesquisas de bactérias aeróbias; propagação em meio de Schaedler enriquecido com sangue de carneiro para pesquisa de bactérias anaeróbias estritas, coloração Gram, observação macro e microscópica das colónias, realização e interpretação de galerias de identificação bioquímicas, realização e interpretação de testes de sensibilidade a antibióticos.

Durante o tempo passado no LMI, procedeu-se também à análise da base de dados dos relatórios de análises bacteriológicas efetuados a amostras provenientes de animais exóticos, seguida da seleção dos relatórios referentes a amostras colhidas a partir de répteis. Posteriormente, concretizou-se a pesquisa das fichas clínicas dos animais selecionados na plataforma Guruvet®, compilando-se a informação reunida em tabelas, utilizadas para a análise estatística do presente estudo.

A realização de estágio curricular em dois locais distintos foi bastante benéfica para a formação da autora, permitindo a aquisição de competências práticas e teóricas em diversas áreas da medicina veterinária. Contribuiu ainda para o desenvolvimento de *soft skills*, essenciais quer para a interação com os tutores dos animais, quer para o trabalho em equipa com colegas futuros.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Pseudomonadaceae*

1.1. Características gerais

Pseudomonas é o género mais importante da família *Pseudomonadaceae*, sendo um grupo muito heterogéneo (Willey et al. 2010), incluindo espécies patogénicas para o homem, animais domésticos e plantas (Palleroni 1981).

Pseudomonas spp. são consideradas organismos ambientais ubiqüitários, sendo encontradas no solo, água, plantas e animais. *Pseudomonas aeruginosa* é também encontrada na pele, membranas mucosas e fezes e é considerada um organismo oportunista, tendo por isso que existir uma quebra no sistema imunitário de modo a que este microrganismo possa invadir, multiplicar-se no hospedeiro e causar doença (Quinn et al. 2011).

A primeira descrição deste género foi feita no final do século XIX, baseando-se apenas na sua morfologia macro e microscópica. Em 1923, a sua caracterização no *Bergey's Manual* veio adicionar diversas características fenotípicas para a diferenciação das espécies, como a coloração Gram, metabolismo do oxigénio ou tipo de flagelos (Peix et al. 2018).

As bactérias deste género são bacilos de Gram-negativo, com dimensão de 0,5 a 1,0 x 1 a 5 µm, e não apresentam necessidades específicas de multiplicação, desenvolvendo-se bem em agar de MacConkey. A maioria é oxidase-positivo e catalase-positivo e apresenta mobilidade através de um ou mais flagelos polares (Quinn et al. 2011). Realizam geralmente respiração aeróbia; no entanto, algumas espécies utilizam o nitrato como o recetor terminal de eletrões na respiração anaeróbia (Willey et al. 2010).

Em 1920, Dooren de Jong relatou que espécies de *Pseudomonas* são agentes ativos de mineralização de matéria orgânica (Palleroni 1981). São, por isso, consideradas organismos quimioorganotróficos e têm capacidade de degradar uma grande variedade de moléculas orgânicas. As *Pseudomonas* fluorescentes podem usar aproximadamente 80 substâncias diferentes como fontes de carbono e energia (Willey et al. 2010).

Muitas estirpes são, ainda, capazes de produzir pigmentos. As estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* podem expressar até quatro pigmentos difundíveis: piocianina (azul esverdeado – pigmento específico desta espécie, que permite a sua identificação), pioverdina (verde amarelado), piorubina (avermelhado) e piomelanina (preto acastanhado) (Quinn et al. 2011).

A espécie *P. aeruginosa* é amplamente estudada, tendo um importante contributo na compreensão de vários mecanismos comuns a diversas bactérias, tais como a emissão de

sinais extracelulares ou a formação de biofilme. O seu genoma inclui genes relacionados com o catabolismo, transporte de nutrientes, efluxo de moléculas orgânicas e regulação metabólica, refletindo a sua capacidade de se multiplicar em diversos ambientes e apresentar perfil de resistência a antibióticos (Willey et al. 2010).

Quanto à taxonomia, *Pseudomonadaceae* é uma família pertencente à classe *Gammaproteobacteria*, conhecida pela sua ubiquidade no ambiente. (Ramos, 2004b, a; Ramos e Filloux, 2007; Cornelis, 2008 citados por Hesse et al. 2018). Esta família foi criada há cerca de um século atrás (Winslow et al. 1916) e a sua definição tem sofrido profundas alterações ao longo dos anos.

A maior revolução na taxonomia bacteriana ocorreu na década de 80 (1980) com a proposta da análise da sequência genética do 16S rRNA para a classificação das bactérias (Woese et al. 1984). Atualmente, as técnicas mais precisas são os métodos baseados no genoma, que englobam tipificação de ácidos nucleicos e a análise da sequência genética (Peix et al. 2018); dentro destas, a análise do 16S rRNA continua a ser uma peça fundamental para a diferenciação entre géneros e de uso obrigatório na descrição de novas espécies bacterianas. Porém, o gene 16S rRNA não é suficientemente discriminatório ao nível da espécie em diversos grupos filogenéticos do género *Pseudomonas*, o que levou à utilização em estudos taxonómicos e filogenéticos de outros genes codificadores de proteínas (Peix et al. 2018). Estes genes são analisados regularmente para a descrição de novas espécies de *Pseudomonas*, estando a ser desenvolvida uma base de dados de MLSA (*multilocus sequence analysis*), técnica muito útil na diferenciação de espécies deste género, designada PseudoMLSA, com o objetivo de compilar múltiplas sequências de genes de estirpes-tipo das espécies descritas desde 2008 (Bennasar et al. 2010).

O número de linhagens que compõem o género *Pseudomonas* tem sido alvo de debate. Atualmente, este é composto por três linhagens principais, baseadas na sequência de genes 16S rRNA, representadas pelas espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas pertucinogena*. No entanto, o valor recomendado para determinar a afiliação da espécie bacteriana num género pré-existente tem um limite mínimo de 94,5% para a semelhança entre as sequências de 16S rRNAs. O estudo de Lalucat e dos seus colaboradores aferiu que o valor mais baixo de semelhança entre espécies de *Pseudomonas* é de 91,2%. Mas, se excluirmos as 17 espécies no grupo *P. pertucinogena*, os valores de semelhança ascendem acima dos 95% e, portanto, acima do limite recomendado para os géneros. Todos os índices indicam, então, que a linhagem de *P. pertucinogena* deveria ser considerada um género diferente (Lalucat et al. 2020).

O desenvolvimento da genómica tem causado alterações profundas na taxonomia bacteriana. A análise de sequências de genes e o conhecimento da sequência completa do

genoma são hoje mais valorizados que os traços fenotípicos na identificação e classificação bacteriana. (Lalucat et al. 2020).

Estudos filogenéticos têm vindo a apontar a grande diversidade de *Pseudomonas* spp., o que justifica os ecossistemas muito heterogêneos ocupados por estas bactérias. É necessário reforçar que muitos dos ambientes em que estas podem estar presentes estão, à data, inexplorados, tornando previsível o aumento exponencial do número de espécies nos próximos anos. Isto, juntamente com a complexidade filogenética do género, levará, provavelmente, ao aparecimento de novos géneros ou à divisão em mais espécies (Peix et al. 2018).

1.2. Fatores de virulência e patogenicidade

As bactérias podem induzir diversos tipos de morte celular em hospedeiros eucarióticos, nomeadamente necrose, apoptose e piroptose, sendo que a maior parte resulta na perda da integridade da membrana e libertação do conteúdo citoplasmático (Filloux e Ramos 2014).

Os produtos bacterianos responsáveis pela alteração do estado hígido ou da sobrevivência do hospedeiro são denominados “fatores de virulência”. O estudo e compreensão destes fatores têm especial importância na microbiologia, biologia da infeção e no desenvolvimento de novas terapias “anti-virulência” que, ao contrário das tradicionais, não previnem a síntese de componentes essenciais aos processos bacterianos e, portanto, não levam a uma rápida seleção de subpopulações bacterianas resistentes (Rasko e Sperandio 2010).

Pseudomonas aeruginosa pode causar múltiplas infeções, locais ou sistémicas, benignas ou capazes de colocar o hospedeiro em risco de vida. Esta espécie pode expressar um vasto conjunto de determinantes de virulência e uma complexa rede regulatória de sinais intra e extracelulares essenciais na patogenia da sua infeção (Tümmler e Klockgether 2017).

Uma vez que *P. aeruginosa* é um organismo oportunista, a invasão do hospedeiro é precedida por uma quebra no seu sistema imunitário (Quinn et al. 2011). Esta pode ter diversas causas que predispõem ao desenvolvimento de infeção, como a presença de doenças concomitantes no hospedeiro ou quebras de barreira desencadeadas, por exemplo, pela inserção de cateteres urinários e vasculares, incisões cirúrgicas ou tubos endotraqueais (Kerr and Snelling 2009). Esta espécie tem a capacidade de alterar o seu estilo de vida entre móvel ou imóvel e adaptar a expressão do conjunto de fatores de virulência e mecanismos empregues consoante o ecossistema em que se encontra (Tümmler e Klockgether 2017).

O primeiro estadió da infeção envolve aderência e colonização, ocorrendo fixação na superfície apical ou basolateral do epitélio. Para tal, a bactéria produz diversos tipos de adesinas, responsáveis pela fixação a diferentes células hospedeiras. As adesinas mais importantes são os pílilis Tipo IV, fímbrias polares, que sofrem extensão e retração, e flagelos (Bucior et al. 2014). As propriedades antifagocíticas da exoenzima S (ExoS), o *slime* extracelular e os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa da bactéria auxiliam os processos de colonização e replicação (Quinn et al. 2011).

Apesar de apresentarem eficácias diferentes, todas as estirpes de *Pseudomonas* são capazes de sofrer internalização em células, tanto fagocíticas como não fagocíticas. Este processo requer um rearranjo do citoesqueleto de actina das células hospedeiras. A manutenção desta característica na evolução de *P. aeruginosa* sugere que desempenha um papel fundamental na sua patogenia e/ou sobrevivência no meio ambiente (Bucior et al. 2014).

Após a invasão, há dano dos tecidos causado por uma panóplia de toxinas e enzimas extracelulares, tais como: a exotoxina A, uma toxina bipartida com componentes de fixação, tóxicos e ativos que, ao serem integrados numa célula, bloqueiam a síntese proteica através de ADP-ribosilação do fator de alongamento 2, o que resulta em morte celular; a fosfolipase C, uma hemolisina; e proteases, incluindo a elastase, que medeiam os danos celulares nos pulmões e vasos sanguíneos (Quinn et al. 2011).

A infeção pode-se manter localizada ou disseminar-se pelo hospedeiro; este último processo é favorecido pela ExoS e a toxicidade sistémica é atribuída à exotoxina A e à endotoxina (Quinn et al. 2011).

Algumas estirpes de *Pseudomonas* produzem pigmentos que estão envolvidos na patogenia da infeção, como a pioverdina (PVD), que atua como um sideróforo com um papel importante no estabelecimento do agente patogénico no hospedeiro (Granato et al. 2016). A produção de importantes fatores de virulência supracitados, como a exotoxina A ou as proteases, é dependente de PVD pois é induzida pela ausência de ferro. A estrutura da PVD é altamente variável entre espécies e até mesmo entre estirpes da mesma espécie, como acontece, por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa*, que pode expressar para três tipos distintos de PVD (Visca et al. 2007). Por sua vez, a piocianina consegue gerar moléculas de oxigénio reativas e, consecutivamente, produzir dano nas células hospedeiras ao aceitar diretamente eletrões de agentes redutores e transferi-los para o oxigénio (Quinn et al. 2011). Este pigmento, ao alterar o ciclo redox e ao aumentar o stress oxidativo, exerce um efeito direto em diversas vias de sinalização para aumentar a secreção de citocinas inflamatórias e acelerar a apoptose dos neutrófilos (Liu e Nizet 2009).

As bactérias de Gram-negativo são compostas por uma membrana celular dupla com um sistema de secreção proteica complexo (Azam e Khan 2019). O sistema de secreção Tipo III (SST3) e os seus efetores são determinantes significativos de virulência de *P. aeruginosa* (Tümmler e Klockgether 2017). A biogénese e regulação do SST3 nesta espécie bacteriana é assegurada por trinta e seis genes codificados em cinco operões que estão agrupados no cromossoma de *P. aeruginosa*. Este sistema complexo pode ser dividido em cinco partes: o complexo agulha (I), constituído por proteínas que transportam substratos do citosol bacteriano para o ambiente extracelular; o aparelho de translocação (II), composto por proteínas que translocam proteínas secretadas para as células hospedeiras; proteínas que regulam o processo de secreção (III); proteínas chaperona (IV), que facilitam a secreção de proteínas associadas; e proteínas efetoras (V), que são injetadas para o interior das células hospedeiras (Hauser 2009).

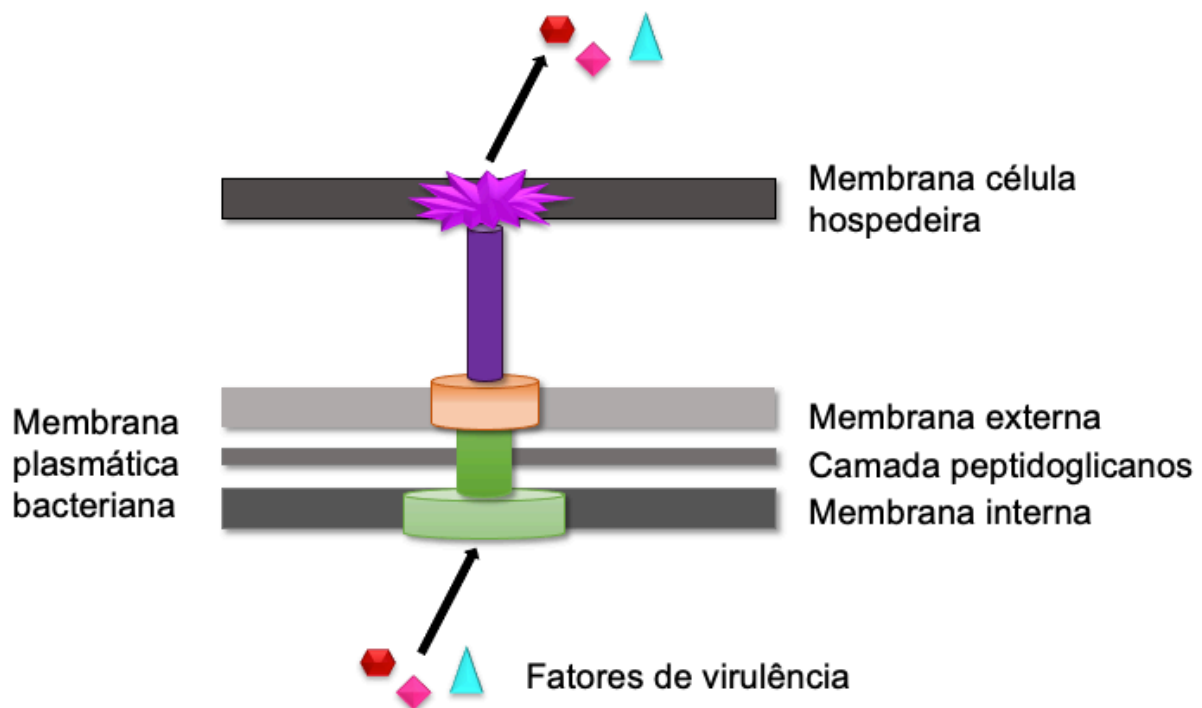


Figura 1- Esquema representativo do sistema de secreção tipo III (original da autora)

O complexo agulha (I) é uma estrutura supramolecular constituída por uma base multi-anel e um filamento em forma de agulha. Pensa-se que este filamento servirá de canal para a passagem de fatores secretados pela bactéria e de moléculas sinal para contacto com a célula hospedeira. O conhecimento atual acerca deste complexo é limitado, sendo assim necessário proceder a mais estudos para compreender as suas funções concretas no processo de secreção. O aparelho de translocação (II) inclui um poro criado na membrana proteica da célula hospedeira que aceita as proteínas efetoras secretadas pelo complexo

agulha e as transporta até à membrana plasmática da célula hospedeira; em *P. aeruginosa*, são usadas três proteínas para a translocação: PopB, PopD e PcrV. As duas primeiras são sintetizadas pelo complexo agulha e interagem entre si e com a membrana da célula hospedeira para formarem o poro de translocação. PcrV também é sintetizada pelos genes que codificam o complexo agulha, sendo necessária durante o processo, mas não parece ser parte constitutiva do poro. Este aparelho aparenta ter outras funções para além do transporte proteico, uma vez que a formação do poro é suficiente para causar a morte das células hospedeiras, direta ou indiretamente através, respetivamente, do aumento da permeabilidade da membrana ou da ativação de variadas respostas de defesa celular de origem inflamatória, que resultam em morte celular por apoptose e necrose. As proteínas responsáveis pela regulação da secreção (III) atuam ao controlar a transcrição dos genes do SST3 e ao iniciar a secreção. As chaperonas (IV) ligam-se a algumas proteínas específicas secretadas pelo SST3, efectoras ou não. Esta ligação facilita o armazenamento da proteína no citosol bacteriano e o correto transporte da mesma até ao complexo agulha. SpcS é a chaperona que se liga tanto à ExoS como à Exo T e é necessária para a secreção máxima destas proteínas; SpcU liga-se à ExoU, não tendo ainda sido identificada nenhuma chaperona da ExoY. Encontram-se identificadas quatro proteínas efectoras (V) de *Pseudomonas aeruginosa*: ExoS (a), ExoT (b), ExoU (c) e ExoY (d) (Hauser 2009). Diferentes combinações destas proteínas têm efeitos significativos na função da barreira epitelial e cicatrização de feridas (Kerr e Snelling 2009).

Uma vez que a maior parte das estirpes desta espécie não tem o conjunto completo de genes que codificam para estas proteínas, as proteínas efectoras secretadas definem o fenótipo de uma estirpe durante a infeção. ExoS (a) é uma toxina bifuncional com ribosiltransferase, responsável pela disrupção do citoesqueleto de actina, inibição da síntese de DNA, produção de vesículas, endocitose e, conseqüentemente, morte celular por apoptose e necrose. ExoT (b) é semelhante na estrutura e no modo de atuação à ExoS, levando também a morte celular por apoptose. ExoU (c) é uma potente fosfolipase com atividade em diversos substratos, como fosfolípidos, lisofosfolípidos e lípidos neutros; esta enzima sofre processamento no interior da célula hospedeira, onde duas moléculas de ubiquitina são adicionadas à Lys178 da proteína, mas a importância desta modificação na sua patogenicidade permanece incerta. Provoca uma rápida morte de células eucarióticas consistente com necrose, através da perda da integridade da membrana plasmática em 1 a 2 horas. ExoY (d) é uma adenilciclase que requer um cofator da célula hospedeira, ainda não identificado, para completar a sua atividade enzimática; provoca disrupção do citoesqueleto de actina, inibição da captação bacteriana pelas células hospedeiras e aumenta a permeabilidade endotelial (Hauser 2009).

Alguns isolados de *P. aeruginosa* apresentam uma sobreprodução de alginato, um polissacarídeo extracelular que origina colônias com uma morfologia mucóide. Pensa-se que esta substância tenha diversas características que favorecem a sobrevivência bacteriana no organismo do hospedeiro, nomeadamente a eliminação de radicais livres libertados pelos macrófagos, o que proporciona uma barreira física que dificulta a fagocitose e a inibição da quimiotaxia de neutrófilos e da ativação do complemento. O alginato parece também ser importante na formação de biofilme por *P. aeruginosa* (Driscoll et al. 2007).

A formação de biofilme é uma estratégia adotada por estas bactérias para desenvolverem resistência contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Esta habilidade está diretamente relacionada com a sua persistência no organismo do hospedeiro e em superfícies abióticas, pois ao organizar-se como uma massa complexa de células fixa a uma superfície, *P. aeruginosa* pode ser significativamente mais resistente a antibióticos e biocidas do que quando se encontra num estado planctónico (Quinn et al. 2011). A organização em biofilme pode também ocorrer no interior do hospedeiro e está relacionada com a patogenia de infeções associadas a dispositivos internos (p.e. cateteres) e outros materiais protéticos (Kerr e Snelling 2009).

Estruturalmente, o biofilme é constituído por uma Substância Polimérica Extracelular (SPE), que contém exopolissacarídeos, DNA extracelular, proteínas, lípidos e substâncias húmicas e representa 50 a 90% da sua massa orgânica total. A sua formação ocorre na seguinte ordem: adesão do organismo à superfície, multiplicação, formação e destacamento do biofilme. Esta estrutura atua como um escudo protetor para as bactérias que o compõem, mas permite a penetração de minerais e outras substâncias essenciais para a multiplicação bacteriana (Brindhadevi et al. 2020). No entanto, é criado um gradiente de disponibilidade de nutrientes e oxigénio ao longo do biofilme, sendo que o nível destas substâncias é mais reduzido nas camadas internas, fazendo com que as bactérias nelas inseridas apresentem uma atividade metabólica mais baixa e um perfil de resistência aos antimicrobianos mais extenso (Drenkard 2003).

As bactérias conseguem comunicar entre elas através de diversas vias biológicas e, assim, coordenar o comportamento da população. Este mecanismo de regulação da expressão génica dependente da densidade celular é denominado *Quorum sensing* (QS) e garante uma maior eficácia e sucesso do comportamento bacteriano. Baseia-se na interação entre pequenas moléculas sinalizadoras secretadas pela bactéria, denominadas autoindutores (AI), e no reconhecimento das mesmas pelos recetores bacterianos. Os AI usados primariamente pelas bactérias de Gram-negativo são os lactona acil-homoserina (LAH) (Li e Nair 2012). O mecanismo do QS assenta em três princípios: a resposta celular depende da concentração de AIs, em que concentrações abaixo do nível limite não são reconhecidas pelas bactérias enquanto concentrações elevadas já despoletam resposta; as

membranas celulares ou membranas citoplasmáticas das bactérias estão envolvidas na detecção dos AIs; e, para além de estar envolvida na ativação da expressão génica das bactérias, a detecção de AIs também acelera a própria produção de mais AIs (Brindhadevi et al. 2020).

O sistema QS em *P. aeruginosa* responde tanto a mudanças na população bacteriana como a sinais de stress no hospedeiro ou ambiente e tem uma hierarquia de quatro QS interconectados: *las*, *iqs*, *pqs* e *rhl*. Os dois sistemas dominantes nesta espécie são o *las* e o *rhl*, responsáveis pela maioria da regulação fisiológica e dos fatores de virulência. QS atua em conjunto com o SST3 e os píllis Tipo IV no progresso da infeção desta espécie bacteriana (Brindhadevi et al. 2020).

1.3. Perfil de resistência a antimicrobianos

As infeções por *Pseudomonas* spp. podem estar associadas a taxas significativas de morbidade e mortalidade (Kerr e Snelling 2009), o que associado ao permanente surgimento e disseminação de estirpes resistentes aos antimicrobianos torna as opções terapêuticas disponíveis atualmente cada vez mais ineficazes. Investigações acerca do perfil de resistência deste microrganismo concluíram que 10,2% dos tratamentos utilizados para infeções por *P. aeruginosa* são ineficazes (Gómez Alvarez et al. 2005). Esta espécie bacteriana está inserida na categoria “crítica” na lista estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de bactérias para as quais a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos é urgente (Rajendran et al. 2019).

A resistência deste género bacteriano pode ser dividida em intrínseca, adquirida e adaptativa (Azam e Khan 2019).

A resistência intrínseca caracteriza-se como a habilidade de uma espécie bacteriana em resistir à ação de antimicrobianos devido a características inatas estruturais ou funcionais (Blair et al. 2015). Agentes patogénicos oportunistas, como *P. aeruginosa*, podem apresentar níveis elevados de resistência intrínseca devido à produção de enzimas inativadoras de antibióticos, uma reduzida permeabilidade da membrana externa e à expressão de bombas de efluxo associadas a multirresistências. As células bacterianas sintetizam enzimas que inativam seletivamente antibióticos através de alterações químicas como a adição de sequências químicas específicas ou a destruição completa da molécula antibiótica. A redução da permeabilidade da membrana bacteriana previne a penetração de antibióticos na célula e deve-se, principalmente, à alteração de proteínas porinas da membrana externa, como por exemplo as OprD, que são proteínas alvo das carbapenemases. Por sua vez, as bombas de efluxo permitem aos microrganismos regular o ambiente celular interno ao ejetarem para

o exterior agentes prejudiciais à bactéria, como antibióticos ou metabolitos tóxicos (Azam e Khan 2019). Cada bomba consiste num sistema tripartido: uma proteína exportadora da membrana citoplasmática, uma proteína da membrana externa e uma proteína de fusão da membrana que atua como ponto de ligação entre a proteína exportadora e a proteína da membrana externa (Kriengkauykiat et al. 2005).

A resistência adquirida em *P. aeruginosa* pode resultar da obtenção de genes externos através de transferência horizontal de genes ou de mutações em genes cromossomais. Estes mecanismos encontram-se relacionados com a produção enzimática, regulação positiva mutacional das bombas de efluxo, permeabilidade reduzida a antibióticos e mutação dos locais de ação alvo, resultando em alteração química ou destruição do antibiótico. Tanto a resistência intrínseca como a adquirida resultam em alterações irreversíveis no fenótipo (Azam e Khan 2019).

A resistência adaptativa é uma resistência induzida que ocorre como resposta à presença de agentes antimicrobianos ou a alterações das condições ambientais em que as bactérias estão inseridas. A grande capacidade de adaptação de *P. aeruginosa* pode ser explicada pelo facto de possuir um dos maiores genomas bacterianos conhecidos até à data, com uma presença elevada de genes regulatórios quando comparada com outras espécies bacterianas. Nesta espécie, muitos genes reguladores estão envolvidos tanto na resistência a antimicrobianos como na virulência da bactéria. Como referido anteriormente, *Pseudomonas* spp. consegue alterar rapidamente o seu estilo de vida de planctónico para sésil, ao organizar-se em biofilme e aumentando assim a sua capacidade de resistência aos antibióticos devido à matriz de exopolissacarídeos que atua como uma barreira à difusão. No entanto, diferentes antibióticos atuam em diferentes regiões destas massas celulares devido à distinta atividade metabólica das células (Azam e Khan 2019). A diferente densidade bacteriana ao longo do biofilme cria um gradiente de disponibilidade de nutrientes e oxigénio dentro desta estrutura; assim sendo, as bactérias localizadas numa posição periférica têm um melhor acesso a estes compostos do que as localizadas numa posição central, levando então a diferenças nas suas atividades metabólicas e à heterogeneidade da população. Uma vez que a maior parte dos antibióticos atuam em células metabolicamente ativas, isto resulta em diferentes suscetibilidades dentro da população do biofilme, o que tem uma contribuição considerável para a resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos (Drenkard 2003).

À medida que o aparecimento de infeções causadas por bactérias multirresistentes foi aumentando, surgiu a necessidade de criar definições harmonizadas a nível global para a classificação, compreensão e comparação de informação acerca deste fenómeno. Como tal, um grupo de peritos internacionais juntou-se numa iniciativa do Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (CEPCD) e do Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (CCPD) para criar uma terminologia internacional *standard* da descrição dos perfis de resistência

adquirida. Os perfis foram divididos em três categorias: multirresistentes (MR), em que o isolado não é suscetível a pelo menos 1 agente em 3 ou mais categorias de antimicrobianos; extensivamente resistentes (XR), em que o isolado não é suscetível a pelo menos 1 agente em todas as categorias exceto 2 ou menos categorias de antimicrobianos e pan-resistentes (PR), em que o isolado não é suscetível a todos os agentes em todas as categorias bacterianas (Magiorakos et al. 2011).

1.3.1. Resistência a β -Lactâmicos

Os β -lactâmicos são uma classe de antibióticos usados frequentemente no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. A resistência a estes agentes está, no entanto, a aumentar e é mediada por vários mecanismos, nomeadamente clivagem antibiótica por β -lactamases, expulsão de antibióticos por mecanismos de efluxo endógenos e diminuição da captação de antibióticos devido à perda de porinas da membrana externa (Poole 2011).

As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico destes antibióticos, destruindo assim a sua porção ativa e tornando-os ineficazes (Gómez Alvarez et al. 2005). Até hoje foram descritas quatro classes destas enzimas, de A a D, todas presentes em *P. aeruginosa* (Poole 2011). A divisão nestas classes tem por base as sequências de aminoácidos. A classe A é composta pelas β -lactamases de serina; a classe B, constitui as metalo- β -lactamases, que requerem a presença de um ião metálico bivalente, geralmente o ZN^{2+} , para a sua atividade; a classe C, também conhecida como o conjunto de β -lactamases “AmpC” e a classe D, também denominada por OXA β -lactamases (Hall e Barlow 2005).

Pseudomonas aeruginosa contém, geralmente, genes cromossomais que codificam duas β -lactamases endógenas: AmpC, uma cefalosporinase classe C e PoxB, uma oxacilinase classe D. AmpC é comum em muitas bactérias de Gram-negativo e a sua expressão é induzida pela presença de diversos antibióticos β -lactâmicos, contribuindo para a resistência intrínseca da bactéria a aminopenicilinas e certas cefalosporinas (Hall e Barlow 2005).

A ativação do gene *ampC* é o mecanismo de resistência a β -lactâmicos mais comum em *P. aeruginosa* (Poole 2011).

Bactérias do género *Pseudomonas* têm ainda a capacidade de adquirir genes que codificam para β -lactamases, através de plasmídeos ou por transposões, incluindo sequências de inserção (SI) (Poole 2011). Acredita-se que as SI consigam mobilizar genes cromossómicos de uma bactéria e transferi-los por conjugação a outras espécies ou géneros bacterianos. Este mecanismo de mobilização parece ser de grande importância pois

consegue, em teoria, mover qualquer secção de DNA (Toleman et al. 2006). Apesar das primeiras β -lactamases adquiridas descobertas serem enzimas de curto espectro e classe A que só apresentam capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de espectro reduzido, mais recentemente foram descritas em *P. aeruginosa* β -lactamases de largo espectro (BLLE) capazes de hidrolisar, para além destes compostos, cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e monobactamos, sendo o último de uso exclusivo em medicina humana (Poole 2011; WHO 2018).

Os carbapenemos são uma classe de antibióticos β -lactâmicos com uso exclusivo em medicina humana (WHO 2018) muito importante no tratamento de infeções causadas por *Pseudomonas* spp., principalmente as associadas a bactérias AmpC⁺, uma vez que apesar destes compostos serem excelentes indutores de AmpC, a sua rápida atividade bactericida e estabilidade à hidrólise tornam-nos eficazes contra estas bactérias antes de terem sido induzidas quantidades suficientes da β -lactamase (Jones 1998; Poole 2011). O desenvolvimento mais preocupante na resistência de *Pseudomonas* será, talvez, o surgimento da resistência a estes compostos pela produção de carbapenemases por algumas estirpes ou pela diminuição da permeabilidade da membrana externa a estes antibióticos (Kerr e Snelling 2009). As carbapenemases tratam-se de β -lactamases capazes de hidrolisar estes antibióticos e, em *P. aeruginosa*, foram detetadas carbapenemases das classes A, D e B. No entanto, as de classe B são as maiores responsáveis por elevados níveis de resistência a estes antibióticos, seguidas pela perda ou alteração da função da porina OprD, que permite a entrada de carbapenemos na célula bacteriana (Gómez Alvarez et al. 2005).

1.3.2. Resistência a Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas (FQ) são uma classe importante de antibióticos usada regularmente no tratamento de infeções por *P. aeruginosa*, devido à sua segurança, perfil farmacocinético e dose oral adequada (Gasink et al. 2006). Esta classe atua na topoisomerase II A ou DNA girase e na topoisomerase IV das bactérias, que desempenham um papel essencial na replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA (Poole 2011). No entanto, *P. aeruginosa* rapidamente se torna resistente a estes compostos, através de mutações nos genes que codificam para a topoisomerase II (*gyrA*) e a topoisomerase IV (*parC*) e mutações nos genes reguladores das bombas de efluxo (Jalal et al. 2000).

Em bactérias de Gram-negativo, as FQ atuam principalmente na topoisomerase II, sendo que as mutações que conferem resistência ocorrem geralmente nos genes que codificam para esta enzima, sendo que em estirpes altamente resistentes pode também ocorrer a mutação adicional do gene que codifica para a topoisomerase IV (Poole 2011).

Cada bomba de efluxo bacteriana tem um conjunto preferencial de substratos com origem em agentes microbianos, no entanto, as fluoroquinolonas são um substrato comum a todas as bombas de efluxo Mex conhecidas (Kriengkauykiat et al. 2005). Quatro membros da família de resistência-nodulação-divisão (RND) de bombas de efluxo estão envolvidos no metabolismo bacteriano de FQ: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (Poole 2011). A expressão constitutiva de MexAB-OprM apresenta um importante papel nos níveis de suscetibilidade de *Pseudomonas* às FQ (Li et al. 2015), uma vez mutações nos genes responsáveis pela sua codificação irão provocar uma superexpressão destas bombas de efluxo, um aumento da excreção dos antibióticos pela bactéria (Gasink et al. 2006) e, conseqüentemente, um aumento da concentração mínima inibitória (CMI) destes antibióticos (Driscoll et al. 2007).

1.3.3. Resistência a Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (AG) estão entre os antibióticos de largo espectro mais usados no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias de Gram-negativo (Toleman et al. 2006). Porém, a utilização está, mais uma vez, associada ao desenvolvimento de resistências, com a aquisição de enzimas modificadoras de aminoglicosídeo, a ação de bombas de efluxo endógenas e a existência de metilases de rRNA (Poole 2011).

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (EMA) levam à inativação do antibiótico através de fosforilação, acetilação ou adenilação. A fosforilação em *P. aeruginosa* envolve fosforiltransferases de aminoglicosídeo, sendo as enzimas mais predominantes as que atuam no grupo 3-OH destes compostos e que concedem resistência a AG que não são tipicamente usados no tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana. O processo de acetilação é levado a cabo por acetiltransferases de aminoglicosídeo (AAC); as AAC são caracterizadas consoante a posição do grupo amina que modificam, sendo as mais comuns as que atuam nos grupos 3 e 6, a 3-N-acetiltransferase de aminoglicosídeo [AAC(3)] e a 6'-N-acetiltransferase de aminoglicosídeo [AAC(6')]. Em *P. aeruginosa*, a família de AAC(6') é a mais determinante da resistência a esta classe de antibióticos, em que duas subfamílias já foram descritas: a subfamília I, associada à resistência à tobramicina e à amicacina e a subfamília II, associada à resistência à tobramicina e à gentamicina. A família de AAC(3) está associada à resistência à gentamicina e, menos frequentemente, à resistência à tobramicina. O processo de adenilação envolve enzimas conhecidas como nucleotidiltransferases, sendo a mais comum em *P. aeruginosa* a ANT(2')-I, que apresenta capacidade para inativar a gentamicina e tobramicina mas não amicacina e a ANT(4')-II, que está associada à resistência à tobramicina e à amicacina (Poole 2005).

A resistência independente de enzimas de inativação ocorre devido à ação das bombas de efluxo bacterianas que expulsam os aminoglicosídeos do meio intracelular bacteriano, limitando a sua atuação. Pensa-se que o sistema de efluxo MexXY-OprM é o que está mais envolvido neste mecanismo, devido à descoberta constante de mutações no gene *mexZ* em isolados pan-resistentes de *P. aeruginosa*; o gene *mexZ* codifica o repressor MexZ responsável pelo controlo da operação *mexXY* que, por sua vez, codifica o sistema de efluxo supracitado (Poole 2011; Oliver et al. 2015).

Mais recentemente foi descoberto um terceiro mecanismo de resistência, também associado a estirpes de *P. aeruginosa* pan-resistentes, devido à ocorrência de metilação do 16S rRNA do local A da subunidade 30S ribossomal, o que interfere com a ligação dos AG e promove o desenvolvimento de elevados níveis de resistência a composto clinicamente relevantes como gentamicina, amicacina e tobramicina (Poole 2011).

1.3.4. Resistência a Antibióticos Policatiónicos

As polimixinas ligam-se à membrana celular da bactéria e provocam a disrupção da sua permeabilidade, levando à libertação dos componentes intracelulares (Poole 2011). Têm uma ação bactericida rápida contra bactérias de Gram-negativo mas, com a sua introdução em protocolos terapêuticos, surgiram também preocupações acerca dos seus variados efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular. A descoberta de novos compostos mais seguros fez com que o uso clínico das polimixinas fosse substituído gradualmente (Tam et al. 2005).

No entanto, o aumento da multiresistência a antimicrobianos levou, novamente, ao aumento do uso de polimixinas como a última opção terapêutica viável para infeções por *Pseudomonas* spp. multiresistentes. A utilização destes agentes, principalmente de colistina, é muito eficaz no tratamento destas infeções. Apesar disso, há já relatos de isolados clínicos que apresentam resistência à polimixina B e à colistina (Poole 2011).

O método de resistência ainda é desconhecido, mas a substituição do lípido A do LPS por arabinose tem sido associado ao desenvolvimento *in vitro* deste tipo de resistência por *P. aeruginosa* (Poole 2011).

Com o aumento da ineficácia de diversos compostos contra *P. aeruginosa* e a existência de estirpes resistentes a colistina, tratamento de última linha, torna-se clara a necessidade urgente de descobrir novas opções terapêuticas mas também de garantir um uso racional dos recursos disponíveis atualmente, evitando assim as consequências catastróficas que podem advir deste problema de saúde pública.

2. Características da infecção por *Pseudomonadaceae* em répteis

2.1. Características gerais dos répteis

Os répteis evoluíram de animais semelhantes aos anfíbios há cerca de 312 milhões de anos atrás (Rios e Zimmerman 2015) e são considerados o grupo de vertebrados terrestres que apresenta o maior grau de diversidade ao nível da espécie (Tingley et al. 2016). Existem mais de 10 000 espécies descritas (Tingley et al. 2016), sendo que a maior parte corresponde a lagartos e cobras, enquanto que as tartarugas, crocodilos e tuataras representam apenas 4,1% de todos os répteis existentes (Uetz 2000).

Taxonomicamente, estes animais pertencem à classe Reptilia (Goodrich 1916). Esta classe foi caracterizada pela primeira vez em 1768 por Laurenti, com o objetivo de agrupar os animais tetrápodes excetuando mamíferos e aves (Modesto e Anderson 2004). Não é considerada uma classe monofilética, uma vez que os seus elementos não descendem de um único ancestral comum. Desta fazem parte os ancestrais de Mammalia, os ancestrais das aves e os primeiros amniotes semelhantes aos anfíbios, que se adaptaram a um modo de vida terrestre (Goodrich 1916). As aves e os mamíferos estão relacionados mais intimamente aos répteis do que entre si (Jacobson 2007).

A classe Reptilia é constituída por quatro ordens: Chelonia, que engloba tartarugas; Crocodylia, composta por animais como crocodilos e jacarés; Squamata, que inclui lagartos, anfisbenas e cobras e Rynchocephalia, constituída por tuataras. A relação filogenética entre as três primeiras ordens ainda não está bem definida (Jacobson 2007).

Os quelónios são os répteis mais antigos, surgindo antes dos dinossauros há cerca de 300 milhões de anos. A ordem Chelonia é composta por 14 famílias, 97 géneros e 327 espécies (Divers e Stahl 2019); está, ainda, subdividida em duas subordens: Pleurodira e Cryptodira, sendo que a última engloba quase a totalidade das famílias de quelónios existentes (Jacobson 2007). As tartarugas são os únicos representantes desta ordem que ainda habitam o nosso planeta e, consoante a espécie, têm uma esperança média de vida que pode variar entre os 50 e os 100 anos, em liberdade. A maior parte destes animais apresenta um estilo de vida aquático ou anfíbio (Divers e Stahl 2019).

Na ordem Crocodylia, há 24 espécies de crocodilos reconhecidas, divididas em 3 famílias: Alligatoridae, Crocodylidae e Gavallidae (Divers e Stahl 2019). A linhagem evolutiva dos crocodilos é a mesma que deu origem aos dinossauros e às aves (Jacobson 2007). Estes animais podem ser encontrados em cerca de 90 países e habitam regiões tropicais e subtropicais. Ao contrário do que se verifica em Portugal, há países que permitem mantê-los como animais de estimação; no entanto, garantir a boa qualidade de vida dos animais e um ambiente seguro para os tutores é bastante difícil, devido ao tamanho das instalações

necessárias e às particularidades anatómicas e fisiológicas únicas que os diferenciam dos restantes grupos de répteis (Divers e Stahl 2019).

A ordem Squamata é a mais diversificada, composta por três subordens: Sauria, Amphisbaenia e Ophidia (Jacobson 2007). A subordem Sauria é composta por 16 famílias de lagartos, sendo que estes animais são os répteis que apresentam uma morfologia mais variável entre si, podendo apresentar ou não membros. A subordem Amphisbaenia, engloba 4 famílias de anfisbenas, animais exclusivamente subterrâneos que podem ser encontrados nas regiões tropicais dos continentes africano, americano e asiático. Por sua vez, as cobras e serpentes estão categorizadas na subordem Ophidia e, consoante o método de classificação utilizado, o número de famílias pode variar entre 14 e 17, que habitam variadíssimos ambientes desde desertos a zonas tropicais. As cobras e os lagartos têm uma afiliação estreita entre eles e partilham mais de 50 características comuns (Divers e Stahl 2019).

A última ordem, Rynchocephalia, é formada por apenas 2 espécies de tuataras. Historicamente, estas espécies podiam ser encontradas em diversas regiões a nível mundial, no entanto, atualmente centram-se apenas num pequeno número de ilhas junto à costa da Nova Zelândia. As classes Rynchocephalia e Squamata estão relacionadas estreitamente e compõem a subclasse Lepidosauria (Jacobson 2007).

2.2. Fontes de contaminação

Apenas um reduzido número de espécies bacterianas foi identificado como o agente causador primário de doença em répteis, sendo que a maior parte das infeções clínicas bacterianas é secundária a, por exemplo, infeções virais ou más condições de manejo (Pasmans et al. 2008).

A pele de répteis saudáveis possui diversas espécies bacterianas, sendo a maior parte aeróbias de Gram-negativo, o que poderá sugerir que estas tenham origem nas fezes dos animais ou no ambiente em que estes estão inseridos. Muitos destes microrganismos são potencialmente patogénicos para os seus hospedeiros, nomeadamente *Pseudomonas* spp., que pode levar ao desenvolvimento de doença cutânea e septicémia (Elkand e Cooper 1980).

Durante o período de hibernação, há diminuição da temperatura corporal do réptil e, provavelmente, dos seus mecanismos de defesa, o que pode contribuir para a infeção da pele por bactérias e/ou fungos (Elkand e Cooper 1980).

O stress é a maior causa da excreção de agentes patogénicos pelo animal (Ebani e Fratini 2005); esta excreção pode ocorrer através de descargas respiratórias e diarreia e, associada a um manejo incorreto, pode promover a disseminação entre animais da mesma

comunidade (Divers e Stahl 2019). De facto, um estudo realizado por Colinon et al. em 2010 demonstrou a presença da mesma estirpe de *P. aeruginosa* em isolados originários de água e presas utilizadas na alimentação dos animais, da cavidade oral dos tutores e da cavidade oral dos répteis. Isto comprova não só a existência de diversas fontes de possível colonização dos animais, como também a capacidade de ocorrência de contaminação cruzada entre cobras e tutores (Colinon et al. 2010).

As más condições de higiene e crueldade animal observadas, por vezes, nas cadeias de comércio de animais exóticos contribuem para a ocorrência de traumas e para a disseminação de microrganismos e de doenças. Répteis capturados na natureza podem ter que suportar condições de superlotação e de stress durante o transporte (Pasmans et al. 2017).

Por sua vez, humidade elevada nas instalações favorece a multiplicação de agentes patogénicos bacterianos e fúngicos, que poderão colonizar, posteriormente, o réptil (Williams e Jackson 2016).

As carraças e pulgas podem ser veículos de diversos agentes microbianos para os répteis através da sua mordedura (Elkand e Cooper 1980). Um estudo da microbiota presente em carraças da espécie *Ixodes ricinus* verificou a presença de *Pseudomonas* nestes animais, apontando o seu potencial como vetor de doença por este género bacteriano (Tveten et al. 2013).

Em tartarugas anfíbias mantidas em cativeiro observa-se uma clara predominância de bactérias Gram negativas, uma vez que estes animais estão frequentemente expostos a pequenos volumes de água de aquários e lagoas, estando submersos num meio que favorece a proliferação de bactérias de origem fecal (Di Ianni et al. 2015).

A microbiota comensal de diversas espécies de répteis ainda não está bem definida (Cushing et al. 2011), no entanto, *P. aeruginosa* já foi isolada a partir de diversos répteis aparentemente saudáveis, tanto em estado selvagem como em cativeiro, nomeadamente a partir da conjuntiva ocular de iguana verde (*Iguana iguana*) e de tartarugas anfíbias e terrestres e da cavidade oral, fezes e cloaca de cobras e serpentes, o que pode sugerir que esta espécie poderá fazer parte da microbiota comensal destes animais (Colinon et al. 2010; Taddei et al. 2010; Di Ianni et al. 2015).

2.3. Fatores condicionantes ao desenvolvimento de infeção

Os répteis são animais de companhia não domesticados, com poucas características pré-adaptativas. Têm necessidades biológicas, psicológicas e comportamentais inatas que os predeterminam à vida em liberdade na natureza, onde, apesar de existirem inevitavelmente fatores desencadeantes de stress, os animais estão adaptados a lidar com desafios

específicos desenvolvidos num ambiente equilibrado. Tal equilíbrio não se verifica ambiente em cativeiro, uma vez que este estilo de vida encontra-se, frequentemente, associado a uma má qualidade de vida em terrários com dimensões inadequadas às espécies e pouco compatíveis com a expressão do comportamento normal do réptil (Warwick et al. 2013).

O sistema imunitário destes animais não está totalmente caracterizado. Estes tendem a ter uma resposta imune inata extensa seguida de uma resposta adaptativa mais moderada (Rios e Zimmerman 2015). A resposta inata não requer exposição prévia ao antigénio para se desenvolver completamente e é composta por um grupo variado de moléculas e células que atua rapidamente, como leucócitos não específicos, lisozimas, péptidos antimicrobianos, a via do complemento e febre (Divers e Stahl 2019); esta resposta consegue neutralizar e eliminar diversos microrganismos; todavia, pode haver persistência de agentes patogénicos mais virulentos, o que leva à ativação da imunidade adaptativa (Jacobson 2007). Por sua vez, a resposta adaptativa necessita de exposição prévia ao antigénio para se desenvolver completamente e é mediada por células e anticorpos (Jacobson 2007).

A ausência de nódulos linfáticos e centros germinativos faz com que estes animais tenham uma resposta imune muito inferior à dos mamíferos (Rios e Zimmerman 2015). Na classe Reptilia, o desenvolvimento de uma resposta humoral primária é muito lento, demorando cerca de 4 a 6 semanas, enquanto que na classe Mammalia o mesmo processo ocorre em apenas 4 a 6 dias (Sandmeier et al. 2012). Para além disto, o baço dos répteis é também menos eficaz, o que faz com que estes desenvolvam bacterémia muito mais rapidamente (Divers e Stahl 2019).

Ao avaliar a resposta imune do animal é necessário ter em conta que os seus processos complexos podem ser afetados por diversos fatores, intrínsecos ou extrínsecos, incluindo a idade, estado reprodutivo, características genéticas do animal, tipo de antigénio, temperatura, sazonalidade e stress psicológico (Jacobson 2007). É, ainda, reconhecido que a causa mais comum da diminuição da esperança média de vida de répteis em cativeiro são más condições de manejo (Williams e Jackson 2016). Um manejo incorreto poderá ter sérias consequências no funcionamento do sistema imunitário do animal ao desencadear um quadro de imunossupressão e, conseqüentemente, favorecer o sobrecrecimento da microbiota residente ou a invasão por microrganismos potencialmente patogénicos (Cushing et al. 2011).

Como animais poiquilotérmicos, é fundamental a existência de uma fonte de calor nas instalações, uma vez que a temperatura afeta intimamente a taxa de mobilização de células inflamatórias e a produção de anticorpos humorais, o que pode ser essencial para o desenvolvimento de doença (Elkand e Cooper 1980). Os répteis adotam comportamentos que conduzem a uma hipertermia ou hipotermia voluntária, de maneira a aumentarem as suas hipóteses de sobrevivência. Instalações que não o permitam poderão ter consequências negativas no funcionamento metabólico, digestivo e imunitário destes animais. Por outro lado,

a existência de uma fonte de calor incorretamente posicionada ou monitorizada pode levar a queimaduras extensas e graves (Williams e Jackson 2016), muito propícias ao desenvolvimento de infeções bacterianas por *Pseudomonas* ou *Aeromonas* spp. (Elkand e Cooper 1980).

Num estudo com víboras (*Vipera aspis*) em cativeiro foi demonstrado que a falta de abrigo e de uma fonte de calor geram níveis crónicos elevados de cortisol (Bonnet et al. 2013). Níveis elevados de corticosteróides endógenos estão, por sua vez, associados a uma involução severa do tecido linfóide e comprometimento imunológico (Jacobson 2007).

A sazonalidade tem influência na imunocompetência dos répteis (Jacobson 2007). É provável que durante o período de hibernação haja uma diminuição da eficácia da resposta imune, tornando-os mais suscetíveis ao desenvolvimento de infeção causada por agentes oportunistas, como *Pseudomonas* (Cushing et. al 2011).

A pele dos répteis age como uma barreira queratinizada e impermeável contra a entrada de microrganismos, sendo a primeira linha de defesa destes animais. Uma falha na integridade epitelial, causada, por exemplo, por lesões traumáticas, poderá levar à passagem de bactérias por esta barreira e à ativação do sistema imunitário inato (Rios e Zimmerman 2015). Tendo isto em conta, é natural que os répteis estejam mais expostos a infeções bacterianas durante o período da muda de pele, em que a nova pele é mais sensível e mais facilmente danificada (Elkand e Cooper 1980).

Determinadas práticas no comércio de exóticos contribuem, em grande escala, para a criação de fortes pressões seletivas que favorecem a patogenicidade bacteriana. Um exemplo claro é a reprodução de répteis com mutações de cor, indivíduos apreciados e procurados pelos colecionadores, que envolve a seleção de traços recessivos e que resulta na consanguinidade da população, tornando-a mais vulnerável à disseminação de doenças (Divers e Stahl 2019).

2.4. Sinais clínicos e Diagnóstico

Infeções bacterianas, quer primárias quer secundárias a manejo incorreto, representam a maior causa de apoio veterinário em répteis (Cushing et al. 2011)

Os indicadores primários de algum tipo de lesão, distúrbio ou doença são, frequentemente, alterações comportamentais. O aumento da exibição de ações como agressão, picacismo, prostração, vigilância ou inibição do comportamento reprodutor pode estar associado a comportamentos de stress crónico derivados de um estado de doença. Como tal, é essencial conhecer o comportamento natural destes animais (Warwick et al. 2013).

O primeiro passo para um diagnóstico correto é proceder à recolha da história clínica detalhada e realizar um exame físico completo (Divers e Stahl 2019). Um achado comum associado a infeções bacterianas em répteis é a presença de hipertermia voluntária, uma vez que, tal como referido anteriormente, estes animais adotam comportamentos que aumentam a sua temperatura corporal para melhorar as hipóteses de sobrevivência (Williams e Jackson 2016).

Perante a suspeita de infeção bacteriana, dever-se-à proceder à colheita de amostras relacionadas para realização de cultura e teste de sensibilidade a antibióticos (TSA). Os resultados, em conjunto com a avaliação da microbiota expectável das diferentes espécies de répteis, a quantificação da multiplicação bacteriana e os sinais clínicos permitem, geralmente, o diagnóstico definitivo do agente causador e o protocolo de tratamento adequado (Cushing et al. 2011).

A realização de hemocultura é indicada em casos de suspeita de bacterémia e para identificação de organismos que colonizam locais de difícil acesso para recolha de amostras (Divers e Stahl 2019).

Encontra-se descrito o isolamento de *Pseudomonas* spp. em répteis a partir de amostras colhidas de animais saudáveis mas também a partir de indivíduos com dermatite, estomatite, infeções de ouvidos e olhos, infeções respiratórias e abscessos (Ebani e Fratini 2005; Cushing et al. 2011; Divers e Stahl 2019). A espécie mais relevante da família *Pseudomonadaceae* para a medicina de répteis é *Pseudomonas aeruginosa*. Tendo em conta que se trata de um agente oportunista responsável por diversos quadros clínicos, os sinais exibidos pelos animais são bastante variáveis consoante o órgão ou sistema afetado. Ao se detetar a presença desta espécie numa lesão do paciente é necessário averiguar quais os fatores que levaram ao comprometimento imunitário do réptil (Divers e Stahl 2019).

2.5. Tratamento

Em primeiro lugar, é necessário avaliar se é possível ou não a resolução da infeção por *Pseudomonas* spp. sem o uso de antimicrobianos e qual a gravidade da doença. O uso de antibióticos é indicado prioritariamente em casos em que não há outras opções disponíveis ou quando o atraso da instituição terapêutica possa comprometer o bem-estar do animal (Broens e van Geijlswijk 2018).

Ainda não estão disponíveis diretrizes de tratamento para infeções em animais exóticos baseadas em evidências, pelo que as práticas clínicas utilizadas são, maioritariamente, apoiadas em estratégias aplicadas por especialistas individuais nesta área que se revelaram eficazes (Broens e van Geijlswijk 2018). No entanto, a *Federation of*

European Companion Animal Veterinary Associations (FECAVA) criou um fluxograma que visa auxiliar a tomada de decisão e prevenir o uso desnecessário de antimicrobianos em animais de companhia, que poderá ser ampliado à realidade destes animais (Anexo I).

A obtenção do perfil de suscetibilidade da espécie bacteriana isolada é necessária para a instituição de um plano de antibioterapia adequado (Divers e Stahl 2019). Está descrita a existência de associação entre a aplicação de terapia empírica em répteis doentes e o desenvolvimento de estirpes multirresistentes de *P. aeruginosa* isoladas a partir de diversos ofídios, sáurios e quelónios (Cushing et al. 2011).

Para evitar o desenvolvimento destas estirpes, a seleção de antibióticos com largo espectro de ação deve ser ponderada, pois aumenta o risco de diminuição iatrogénica das bactérias enteropáticas e comensais do animal em detrimento da multiplicação de organismos patogénicos. Assim sendo, o clínico deverá favorecer, sempre que possível, tratamento local com antissépticos ou antimicrobianos de espectro reduzido (Gibbons 2014).

Em répteis, a administração parenteral de fármacos deverá ocorrer na metade cranial do corpo de maneira a evitar o efeito de primeira passagem em substâncias com excreção renal ou metabolização hepática (Gibbons 2014).

É, ainda, importante referir que a chave para a saúde dos répteis em cativeiro está no manejo e, por isso, qualquer plano terapêutico deverá incluir melhorias nesta área, de maneira a acelerar a recuperação do animal e prevenir a reincidência da doença (Divers e Stahl 2019).

Com o intuito de contribuir para o conhecimento da antibioterapia em animais exóticos e estimular a investigação nesta área, diferentes departamentos do Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Georgia, Estados Unidos da América, uniram-se para o desenvolvimento de uma política de administração de antibióticos a animais exóticos baseada no estudo retrospectivo de casos clínicos referidos ao Serviço de Medicina Zoológica desta instituição (Hernandez-Divers et al. 2017). A política supramencionada está representada na tabela 1.

Tabela 1- Política de administração de antibióticos desenvolvida e aplicada no Serviço de Medicina Zoológica do Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Georgia

Fármacos:	Indicações:	Exemplos:
1ª escolha	-Prevenção da infecção em animais imunocomprometidos -Administração intraoperatória ou endovenosa para prevenção de infecção -Antimicrobianos de primeira linha para tratamento de infecções enquanto se aguarda os resultados da cultura bacteriana e TSA ou cálculo da CMI	-Trimetroprima, sulfonamidas ou combinações -Tetraciclina (p.e. oxitetraciclina, doxiciclina) -Penicilinas básicas ou potenciadas (p.e. ampicilina, penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico) -Macrólidos básicos e lincosamidas (p.e. eritromicina, lincomicina, clindamicina) -Aminoglicosídeos -Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração -Quinolonas de 1ª geração (p.e. ácido nalidíxico)
2ª escolha	-Apenas quando os resultados da cultura e do TSA ou cálculo da CMI indicam que os fármacos de 1ª instância são ineficazes	-Cefalosporinas de 3ª geração (p.e. ceftazidima, ceftiofur) -Penicilinas penicilinase-resistentes (p.e. meticilina) -Penicilinas avançadas (p.e. piperacilina, carbenicilina) -Macrólidos avançados (p.e. azitromicina) -Fluoroquinolonas de 2ª geração (p.e. enrofloxacina, orbifloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina) -Cloranfenicol
3ª escolha	-Uso restrito ou proibido em medicina veterinária	-Glicopéptidos (p.e. vancomicina) -Carbapenemos (p.e. imipenem) -Cefalosporinas de 4ª geração ou superiores -Fluoroquinolonas de 3ª geração ou superiores (p.e. levofloxacina) -Quetólidos (p.e. telitromicina) -Lipopéptidos (p.e. daptomicina)

2.6. Utilização de biocidas no tratamento de infecções por

***Pseudomonas* spp. em répteis**

Durante o século XX, com o desenvolvimento de diversos biocidas, observou-se um aumento substancial do número de compostos ativos usados na desinfecção, esterilização e assepsia. A concentração destes agentes na formulação é determinante para a sua atividade antimicrobiana, tendo que existir um equilíbrio entre a eficácia na destruição de microrganismos e a sua toxicidade para o animal (Maillard 2005).

Consoante o seu espectro de ação e efeito que exercem, os biocidas são divididos em quatro categorias: desinfetantes, antissépticos, esterilizantes e conservantes (Paola et al. 2018). A sua atividade antibacteriana pode ser calculada através dos testes de suspensão (Thomas et al. 2005).

Numerosas doenças, nomeadamente de origem viral, imunomediada ou inflamatória, podem estar na origem de sinais clínicos frequentemente atribuídos a infeções bacterianas, o que pode levar à aplicação de uma terapia antimicrobiana empírica desnecessária (Divers e Stahl 2019).

Na medicina herpetológica, tal como em outras áreas de medicina veterinária, é essencial que se reduza a dependência de antibióticos para limitar os impactos negativos na microbiota do indivíduo e consequências alarmantes na saúde humana e ambiental (Divers e Stahl 2019). A terapia local com antissépticos pode apresentar uma eficácia igual ou superior à antibioterapia sistémica em diversos casos como lesões cutâneas simples, lesões traumáticas com infeção moderada, pioderma superficial ou otite externa (Broens e van Geijlswijk 2018; Divers e Stahl 2019).

Os antissépticos mais usados em ambiente hospitalar são o álcool, clorhexidina e iodopovidona (Divers e Stahl 2019; Paola et al. 2018). A pele é a superfície biótica em que são mais aplicados, devido ao contacto permanente com o ambiente exterior que a torna um foco comum de infeções. Há pouca informação acerca do seu uso em répteis, mas em medicina humana são um recurso importante na prevenção e tratamento de infeções após queimaduras, lesões traumáticas e úlceras (Paola et al. 2018).

O desenvolvimento de resistências a estes compostos é menos provável que no caso dos antibióticos, uma vez que o mecanismo dos biocidas envolve diversos locais-alvo e induz uma rápida morte das células bacterianas. Não obstante, a utilização destes compostos em concentrações bacteriostáticas e, portanto, subletais pode fazer com que estes afetem um número menor e limitado de locais-alvo nas células bacterianas, podendo causar tolerância (Maillard et al. 1998; Maillard 2005; Thomas et al. 2005). Alguns estudos indicam que bactérias multirresistentes não apresentam menor suscetibilidade a biocidas do que as que não possuem um perfil de resistência tão elevado (Russell 1999; Maillard 2005; Paola et al. 2018). Conclui-se, portanto, que são necessários mais estudos para clarificar a existência ou não de uma ponte de ligação entre estes dois mecanismos.

2.7. Estratégias de prevenção

O estado de saúde físico e mental dos répteis mantidos em cativeiro não é dependente das interações com os humanos, mas sim da disponibilização de uma ótima nutrição e ambiente ao animal (Pasmans et al. 2017).

Manter uma espécie como animal de companhia deverá ter sempre em vista o melhor bem-estar e qualidade de vida possíveis. Para tal, antes da adoção de um animal de companhia, os tutores devem reunir o máximo de informação possível e esclarecer quaisquer dúvidas junto de um médico veterinário ou através da consulta de fontes bibliográficas fidedignas (Pasmans et al. 2017).

As instalações têm um grande influência no estado de saúde dos animais. Diversos estudos concluíram que os répteis são animais altamente ativos, capazes de percorrer grandes distâncias. Para além disso, adotam posturas fulcrais para a manutenção do seu conforto. Por exemplo, o posicionamento em linha reta é necessário para garantir o correto funcionamento do trato gastrointestinal das cobras. Como tal, o alojamento deve ter sempre dimensões que assegurem que estes animais são capazes de caminhar, expressar os seus comportamentos naturais e manter um estilo de vida dinâmico (Warwick et al. 2013; Williams e Jackson 2016).

Um ponto crítico e que apresenta elevado risco de introdução de doenças numa comunidade é a aquisição de novos répteis. Os novos indivíduos devem ser alojados separadamente e respeitar um período de quarentena em isolamento de geralmente 90 dias, período esse que deve ser adaptado consoante a espécie (Pasmans et al. 2008).

Para evitar contaminação cruzada, os terrários e acessórios devem ser desinfetados regularmente com ácidos orgânicos ou uma diluição a 5% de hipoclorito de sódio, por exemplo. Quanto menor for a quantidade de resíduos orgânicos presentes no material e quanto maior for o tempo de contacto entre as superfícies e os produtos químicos, mais eficaz será o processo de desinfeção (Pasmans et al. 2008).

A manipulação dos animais deverá ser realizada, idealmente, utilizando luvas. Após cada contacto com os répteis ou com o seu ambiente, os manipuladores deverão proceder à assepsia das suas mãos (Pasmans et al. 2008).

Uma vez que os parasitas externos podem ser uma fonte de transmissão de variados agentes microbianos, nomeadamente bactérias, pode-se proceder à aplicação de fipronil ou de uma solução de 1mL (10 mg) de ivermectina diluída em 1L de água nos terrários para garantir a desparasitação dos répteis (Pasmans et al. 2008).

Consultas periódicas de check-up e um despiste regular de doenças com um médico veterinário contribuem para evitar a disseminação de doenças e aumentar a taxa de sobrevivência destes animais em cativeiro (Pasmans et al. 2008).

2.8. Importância de *Pseudomonas* spp. em répteis para a Saúde

Pública

Com o decorrer do tempo, a interação entre humanos e animais tem-se tornado mais ampla e diversificada. A decisão de manter um animal de estimação traz benefícios para o nosso estilo de vida, mas acarreta também um risco potencial de afetar negativamente a saúde humana através de traumatismos, reações alérgicas ou transmissão de zoonoses (Pasmans et al. 2017).

O convívio com répteis envolve não só a possibilidade de envenenamento mas também de desenvolvimento de infecções, a partir do manuseamento dos animais ou de lesões traumáticas causadas por estes, que podem ser fatais (Dehghani et al. 2016). Ainda que possa ocorrer transmissão de parasitas, fungos, vírus e protozoários dos répteis para os humanos, as bactérias são os principais agentes patogênicos responsáveis por zoonoses (Ebani e Fratini 2005).

As mordeduras de répteis são frequentemente responsáveis por disseminação bacteriana. Na Europa, há poucos dados disponíveis acerca do número de casos de lesões traumáticas em humanos causadas por esta classe de animais, contudo, é estimado que nos Estados Unidos da América cerca de 810 lesões de mordedura de iguanas verde (*Iguana iguana*) sejam tratadas anualmente em ambiente hospitalar de emergência (Pasmans et al. 2017).

Grande parte dos traumas causados pela mordedura da espécie de iguana supracitada são superficiais e afetam apenas tecidos moles. Apesar disso, já foram reportadas lesões nos tendões. Cerca de 80% destes traumas ocorrem nos membros superiores dos humanos, particularmente nos dedos e 19% ocorrem na face. Por sua vez, mordeduras causadas por tartarugas já foram responsáveis pela amputação de dedos, fraturas e danos nas estruturas neurovasculares subjacentes aos tecidos moles (Hartsell e Madsen 2013).

A região do corpo humano mais provável de desenvolver infecção e incapacidade a longo prazo é a mão. Estudos retrospectivos concluíram que cerca de 40% das mordeduras nesta zona apresentam infecção posterior, provavelmente devido à sua anatomia complexa e localização superficial de estruturas como ossos, articulações e tendões (Thomas e Brook 2011).

Estas lesões são capazes de levar ao desenvolvimento de infecções mais profundas, com possibilidade de disseminação sistêmica. Diversos fatores influenciam a sua evolução, tais como o estado imunitário, a presença de doenças concomitantes como diabetes ou doença vascular periférica e o abuso do consumo de álcool e podem contribuir para o

aparecimento de complicações como abscessos, artrite séptica, tenossinovite, bacterémia e endocardite (Thomas e Brook 2011)

Os microrganismos isolados a partir de mordeduras refletem, geralmente, a microbiota residente na cavidade oral do agressor assim como a microbiota do ambiente em que se deu o ataque (Thomas e Brook 2011). Encontra-se descrito, por exemplo, que a microbiota oral das cobras e serpentes tem origem fecal, uma vez que as presas podem defecar na boca destes animais enquanto são ingeridas (Abrahamian e Goldstein 2011; Thomas e Brook 2011).

Uma vez que já foi detetada uma grande diversidade de organismos aeróbios e anaeróbios neste tipo de lesões, a realização de uma cultura bacteriana e TSA é, uma vez mais, essencial para a determinação de um plano de tratamento adequado (Ebani e Fratini 2005).

Pseudomonas é um género detetado frequentemente tanto na cavidade oral de diferentes espécies de répteis, como nas lesões de mordedura que estes provocam (Jalal et al. 2000; Montgomery et al. 2002; Garg et al. 2009; Abrahamian e Goldstein 2011; Chen et al. 2011; Thomas e Brook 2011). Podem ser causa direta de doença, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, ou complicar infeções pré-existentes ou causadas por outros organismos. Em humanos, este género bacteriano está associado a infeções cutâneas, do trato urinário, gastrointestinais e respiratórias, dos tecidos moles, dos ossos e das articulações (Ebani e Fratini 2005).

Apesar da escassa informação disponível, existe pelo menos um caso reportado de artrite séptica por *P. aeruginosa* numa criança de 9 anos, em Chester, Inglaterra, associada à mordedura por um lagarto monitor (*Varanus indicus*) mantido em cativeiro (Tehrani et al. 2008). Como referido anteriormente, também já foi comprovada a capacidade de ocorrência de contaminação cruzada de *P. aeruginosa* entre cobras e os seus tutores (Colinon et al. 2010).

Estes factos, aliados ao desenvolvimento de estirpes de *Pseudomonas* resistentes a múltiplos antibióticos em diversas espécies de répteis (Cushing et al. 2011), demonstram a importância de avaliar o impacto real que a manutenção de répteis como animais de companhia tem em termos de saúde pública.

CAPÍTULO III – *Pseudomonas* spp. em répteis de companhia: um estudo retrospectivo

1. Introdução

Répteis em cativeiro são reservatórios de microrganismos zoonóticos, incluindo bactérias do género *Pseudomonas*, pelo que o estudo e monitorização da relação entre estes são de grande importância.

A inexistência de uma descrição clara da microbiota comensal de diversas espécies de répteis, assim como a falta de diretrizes e recomendações em animais exóticos para o tratamento de infeções bacterianas baseadas em evidência, torna o uso de antimicrobianos nesta classe de animais muito suscetível ao erro e uma potencial ameaça para a saúde pública.

Como tal, são necessários mais estudos acerca deste tema e uma vigilância da administração de antimicrobianos a estes animais, assim como do desenvolvimento de estirpes multirresistentes em répteis.

2. Objetivos do estudo

Os objetivos do presente estudo transversal englobam:

- Cálculo da frequência de isolamento de *Pseudomonas* em répteis detidos como animais de companhia ou de coleção, presentes para consulta no Hospital Escolar Veterinário (HEV) entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2020;
- Identificação de fatores que podem predispor para infeção por *Pseudomonas* spp. em répteis;
- Caracterização do perfil de resistência a antibióticos, através do método de difusão em disco (Kirby-Bauer), dos isolados recolhidos em consulta;
- Análise dos protocolos terapêuticos aplicados e da sua eficácia.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostra em estudo

O presente estudo retrospectivo baseou-se na análise de informação recolhida a partir da base de dados do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LMI) da FMV/ ULisboa. Após obtenção e avaliação dos relatórios de análises bacteriológicas realizadas no laboratório no

período de tempo supracitado, selecionaram-se 49 relatórios relativos a 40 répteis. Para serem incluídos no estudo, os relatórios tinham que descrever a origem da amostra, a espécie do animal e os resultados completos da análise bacteriológica, incluindo isolados obtidos e perfil de suscetibilidade. Posteriormente, para averiguar a possibilidade da existência de características dos animais que predispuessem ou influenciassem a infecção por *Pseudomonas* e a possibilidade de relação entre a presença deste género bacteriano e as doenças desenvolvidas, procedeu-se à pesquisa e recolha das fichas clínicas na plataforma Guruvet®, após autorização do Diretor Clínico do HEV, tendo sido possível ter acesso às fichas de apenas 24 répteis, cujos dados foram então utilizados para a análise estatística do presente estudo.

3.2. Recolha de dados

Para os 24 répteis incluídos neste estudo foram registados os seguintes dados: espécie do animal, idade no momento de apresentação à consulta no HEV, género, esterilizado/castrado ou não, origem das amostras colhidas e a doença diagnosticada.

Para os 7 indivíduos a partir dos quais foi possível obter isolados posteriormente identificados como pertencentes ao género *Pseudomonas*, foram registados, adicionalmente, os seguintes dados: espécies bacterianas isoladas, protocolos terapêuticos empíricos aplicados, resultados dos testes de sensibilidade aos antibióticos (TSA), perfil de resistência e, caso tenha existido, alteração da terapêutica empírica instituída com base nos resultados dos TSA.

3.3. Isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp.

A equipa do LMI baseia-se em métodos bacteriológicos convencionais para o isolamento e identificação de agentes potencialmente patogénicos, incluindo *Pseudomonas* spp., esquematizados no seguinte fluxograma:

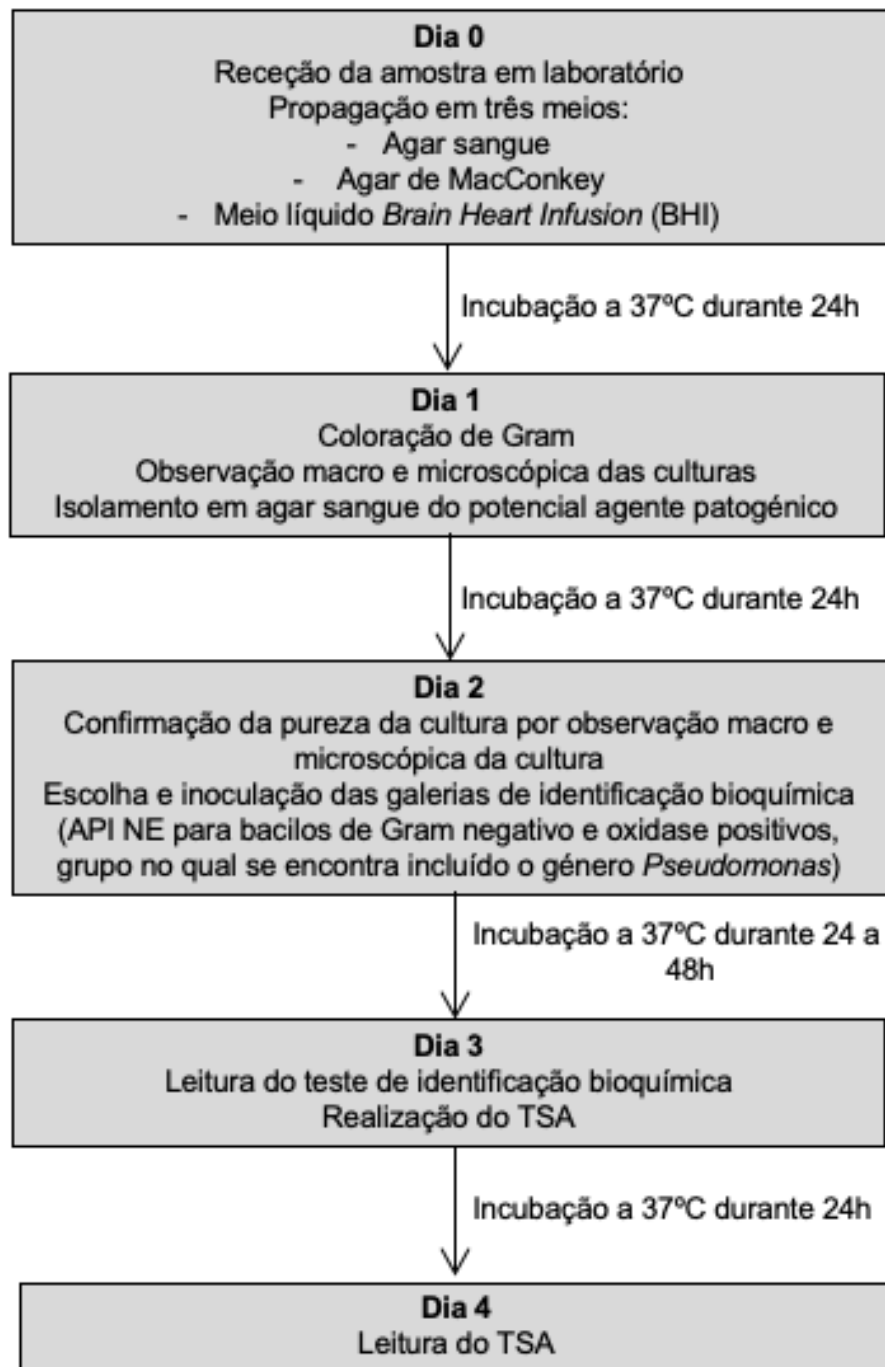


Figura 2- Fluxograma dos métodos bacteriológicos utilizados no LMI para identificação bacteriana

As colónias de *Pseudomonas* spp. apresentam uma morfologia e características bioquímicas próprias, nomeadamente, colónias alargadas e lisas com limites serrilhados, com hemólise variável em meio de agar sangue, com produção de pigmentos difusíveis e crescimento em agar de MacConkey. Para além disso, este género bacteriano é oxidase e catalase positivo (Quinn et al. 2011). No entanto, a sua diferenciação e identificação concreta é realizada através da utilização de galerias de identificação bioquímica.

3.4. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)

Para a caracterização fenotípica do perfil de resistência a antimicrobianos de um agente potencialmente patogénico, a equipa do LMI aplica o método de difusão em disco Kirby-Bauer, muito utilizado a nível mundial devido à sua simplicidade, baixo custo e facilidade na interpretação dos resultados (Hudzicki 2009).

De acordo com o protocolo estabelecido pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), é utilizada uma cultura pura, anteriormente semeada em agar-sangue e incubada a 37°C, para a concretização de uma suspensão bacteriana, em soro fisiológico, com um grau de turvação de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a uma concentração bacteriana entre 1 e 2 x 10⁸ UFC/ml. Posteriormente, essa suspensão é inoculada com o auxílio de uma zaragatoa estéril na superfície de uma placa de Petri com meio de Mueller-Hinton agar utilizando a técnica de sementeira por tapete. De seguida, são aplicados no agar, discos de papel com cerca de 6 mm de diâmetro, impregnados com uma concentração conhecida de um antibiótico. Segundo a base de dados, a suscetibilidade dos isolados obtidos a partir das amostras répteis foi avaliada em relação a um total de 24 antibióticos em combinações diferentes, incluindo: ácido nalidixico, ácido fusídico, amicacina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, carbenicilina, cefalexina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomina, gentamicina, imipenem, marbofloxacina, ofloxacina, penicilina, piperacilina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina e tobramicina.

A placa de Petri é, posteriormente, incubada a 37°C durante 24 horas. Realiza-se a medição dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento (mm), que permite a classificação dos isolados como Suscetível (S), Intermédio (I) ou Resistente (R) à ação de cada composto antimicrobiano, após comparação com os valores *standard* apresentados nas tabelas de interpretação definidas pelo CLSI (CLSI 2009).

3.5. Análise estatística

Após análise da informação disponível para cada animal, procedeu-se à organização e criação de uma base de dados através do programa Microsoft Office Excel®. Com recurso a este programa, foi realizada a análise estatística descritiva das diferentes variáveis dos animais incluídos no estudo, tais como idade, género, espécie e tipo de doença diagnosticada e, ainda, a análise estatística das variáveis presentes nos relatórios de análises bacteriológicas das amostras colhidas a partir destes animais, tais como tipologia da infeção (simples ou mista), géneros bacterianos isolados, resultados dos TSA, entre outros.

Posteriormente, para a análise estatística inferencial utilizou-se o software *R Commander* versão 2.7-0. Tratando-se de um estudo retrospectivo, selecionou-se o modelo estatístico de regressão logística para verificar a existência ou não de associação estatisticamente significativa entre o isolamento de *Pseudomonas* spp. e a idade, género e espécie dos animais, assim como o tipo de doença diagnosticado em contexto de consulta. Em todos os casos, o nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV – Resultados

1. Caracterização da amostra

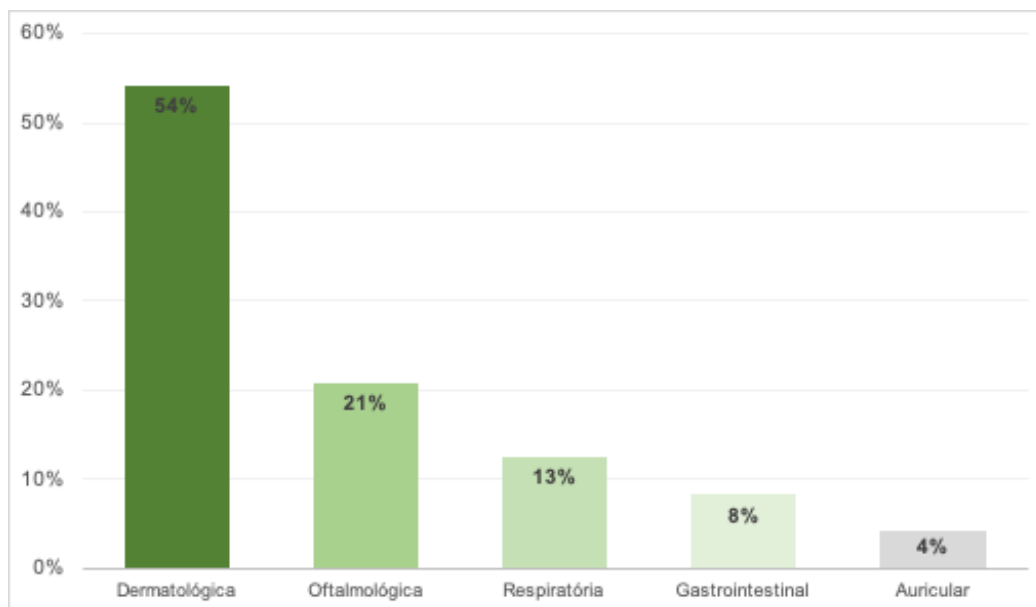
Foram incluídos neste estudo retrospectivo 24 répteis presentes a consulta no Hospital Escolar Veterinário entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2020, a partir dos quais foram obtidas 29 amostras para análise bacteriológica.

O grupo de animais em estudo é constituído por 19 quelónios (79%), 2 ofídios (8%) e 3 sáurios (13%), nomeadamente 11 machos (46%) e 13 fêmeas (54%), todos inteiros. A idade dos indivíduos, no momento de apresentação em consulta, encontra-se compreendida entre 1 mês e 360 meses (30 anos), com uma média de 121,5 meses de idade (≈ 10 anos).

Foi possível obter a identificação ao nível da espécie de 14 animais, descritos como pertencentes a 10 espécies diferentes, nomeadamente *Trachemys scripta*, *Eublepharis macularius*, *Chamaeleo calypttratus*, *Mauremys leprosa*, *Thamnophis eques scotti*, *Pogona vitticeps*, *Pantherophis guttatus*, *Graptemys pseudogeographica*, *Mauremys reevesii* e *Ocadia sinensis*. Os restantes 10 animais, todos quelónios, foram apenas categorizados em relação ao seu meio ambiente como tartarugas anfíbias.

De acordo com as fichas clínicas, qualificou-se o tipo de doença diagnosticado quanto ao sistema de órgãos afetado em dermatológica (n=13), oftalmológica (n=5), respiratória (n=3), gastrointestinal (n=2) e auricular (n=1).

Gráfico 1- Prevalência dos diferentes tipos de doença diagnosticadas na amostra em estudo



Verificou-se, ainda, que quase metade (46%) destes animais se apresentou à consulta no HEV no período da primavera. Dos restantes, 25% apresentou-se no verão, 21% no outono e apenas 8% no inverno.

Categorizaram-se as amostras colhidas no período de tempo abrangido pelo estudo consoante a sua origem anatómica, sendo 62% de origem cutânea, 28% de origem oral e 10% de origem ocular.

Após análise dos relatórios das análises bacteriológicas efetuadas pelo LMI, concluiu-se que não foi possível obter isolamento bacteriano a partir de 2 amostras (7%) enviadas para análise, uma delas colhida a partir de um réptil sujeito a antibioterapia prévia. Das 27 amostras a partir das quais houve isolamento, 59% representam infeções monobacterianas e 41% representam infeções polimicrobianas, associadas a 2 ou mais géneros bacterianos.

2. Isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp.

Verificou-se a presença de *Pseudomonas* spp. em 10 amostras, o que perfaz uma frequência de isolamento de 35%, a segunda mais elevada da totalidade dos géneros bacterianos isolados, precedida por *Aeromonas* spp. Relativamente ao tipo de infeções, 70% destas amostras correspondiam a infeções polimicrobianas e 30% a infeções monobacterianas.

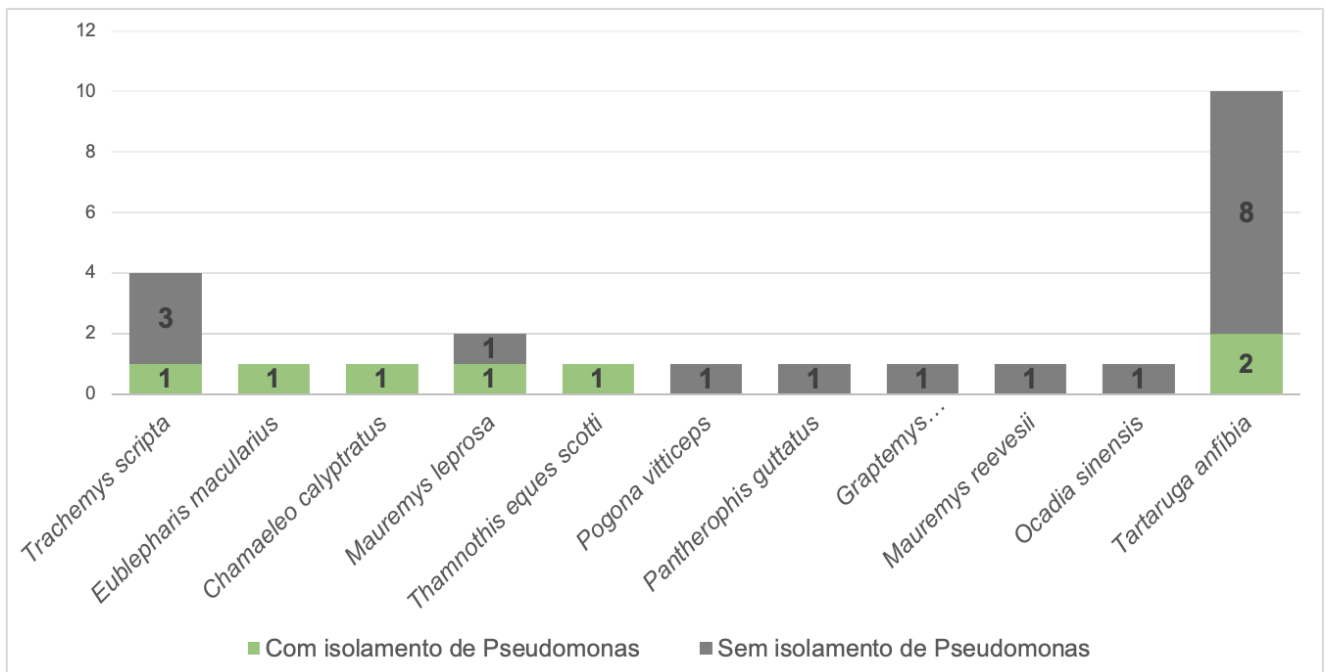
Tendo em conta a origem anatómica das amostras enviadas para o laboratório, *Pseudomonas* foi o agente bacteriano isolado mais frequentemente tanto em amostras

oculares (67%), como em amostras orais (38%). Em amostras cutâneas foi o segundo género isolado mas frequentemente (15%), precedido por *Aeromonas* spp. (39%).

Por sua vez, estas amostras foram obtidas a partir de 7 répteis, 4 quelónios (57%), 2 sáurios (29%) e 1 ofídio (14%). Este grupo de animais é composto por 4 machos (57%) e 3 fêmeas (43%), apresentando uma média de 106,9 meses de idade (≈ 9 anos).

Foi possível isolar este género bacteriano em amostras colhidas a partir de 6 espécies de animais diferentes, conforme demonstrado no gráfico 2.

Gráfico 2- Distribuição do isolamento de *Pseudomonas* spp. nas diferentes espécies incluídas no estudo



Foi possível observar que 57% dos répteis em cativeiro a partir dos quais foi possível isolar *Pseudomonas* spp. têm acesso a um ambiente aquático e 43% vivem exclusivamente em ambiente seco.

A doença oftalmológica foi a mais frequentemente diagnosticada (43%), seguida de doença dermatológica (28,5%) e doença respiratória (28,5%).

Para melhor compreensão e estudo, procedeu-se à numeração destes indivíduos de 1 a 7. Durante o período de tempo supracitado foram colhidas amostras repetidas dos indivíduos 4 e 5, em contexto de consulta no HEV, conforme indicado na tabela 2.

Tabela 2- Caracterização dos animais a partir dos quais foi isolada *Pseudomonas* spp.

ID	Espécie de réptil	Tipo de doença	Espécies bacterianas isoladas
1	<i>Trachemys scripta</i>	Respiratória	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Morganella morganii</i>
2	<i>Eublepharis macularius</i>	Oftalmológica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Alcaligenes faecalis</i>
3	<i>Chamaeleo calytratus</i>	Oftalmológica	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i>
4	Tartaruga anfíbia	Dermatológica	<i>Pseudomonas luteola</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
4.1 ^a	Tartaruga anfíbia	Dermatológica	<i>Pseudomonas luteola</i>
4.2 ^a	Tartaruga anfíbia	Dermatológica	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
5	Tartaruga anfíbia	Dermatológica	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Aeromonas hydrophyla</i> <i>Aeromonas sobria</i>
5.1 ^b	Tartaruga anfíbia	Dermatológica	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6	<i>Mauremys leprosa</i>	Oftalmológica	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
7	<i>Thamnothis eques scotti</i>	Respiratória	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

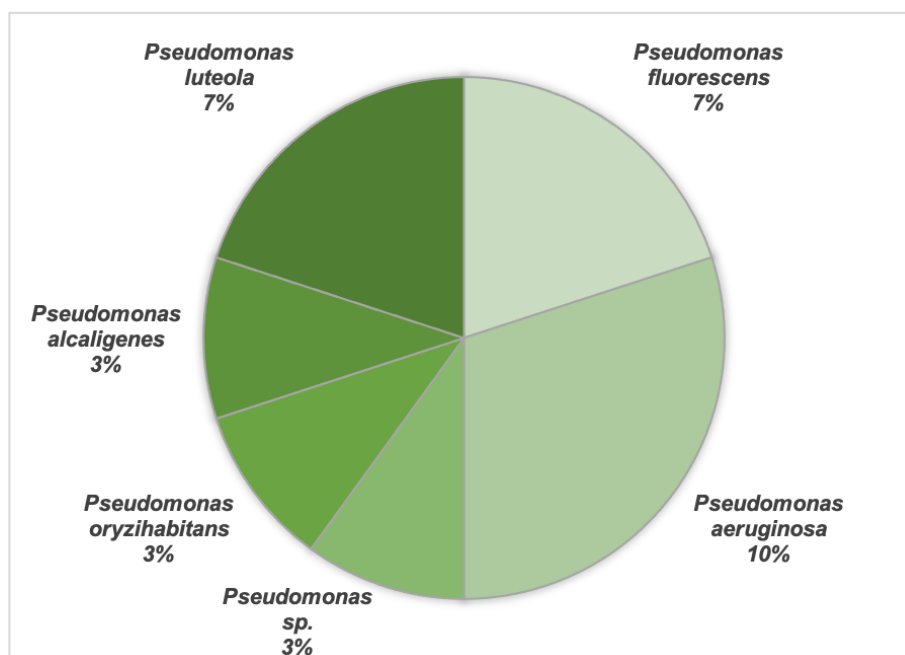
ID – identificação numérica dos indivíduos com isolamento de *Pseudomonas* spp.

^a - isolados obtidos a partir do ID 4;

^b – isolados obtidos a partir do ID 5

Foi possível identificar 5 espécies diferentes de *Pseudomonas* nas amostras analisadas, sendo que na primeira amostra colhida a partir do indivíduo 5 apenas foi possível a identificação do isolado a nível do género. *P. aeruginosa* foi a espécie mais prevalente nos animais em estudo e identificada em 10% da totalidade das amostras (N=24).

Gráfico 3- Frequência de isolamento das diferentes espécies de *Pseudomonas* identificadas na amostra em estudo



2.1. Relação entre o isolamento de *Pseudomonas* e a idade, género e espécie dos répteis, e o tipo de doença diagnosticado

Avaliou-se a existência de associação estatística entre o isolamento de *Pseudomonas* e algumas características dos répteis, tais como idade, género e espécie, sendo que não se observou uma relação estatisticamente significativa entre estas variáveis, como indicado na tabela 3.

Tabela 3- Resultados obtidos através de testes de regressão logística para avaliar a existência de associação entre o isolamento de *Pseudomonas* spp. e a idade, género e espécie dos répteis, e o tipo de doença diagnosticado; o nível de significância estatística foi definido como $p < 0,05$

	Valor de p	Relação de probabilidades IC 95%
Idade	0,704	0,994 - 1,01
Género	0,851	0,707 - 10,10
Espécie	0,255	0,845 - 1,89
Tipo de doença	0,553	0,392 - 1,65

Quanto ao tipo de doença diagnosticado, também não se observou associação estatística entre esta variável e o isolamento de *Pseudomonas* spp. nas amostras.

3. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)

Durante o período de tempo abrangido pelo estudo, o perfil de suscetibilidade dos isolados identificados como pertencentes ao género *Pseudomonas* foi determinado utilizando 23 antibióticos, em combinações diferentes de indivíduo para indivíduo.

Observou-se resistência a um ou mais antibióticos em todos os isolados, O diferente padrão usado não permite concluir o perfil de resistência da amostra em estudo em relação a todos os agentes testados. No entanto, ao longo do tempo, houve 3 fármacos que foram testados em todos os isolados. : cefalexina, em que se observou que 100% dos isolados eram resistentes à sua ação; amoxicilina combinada com ácido clavulânico, em que se verificou que 20% dos isolados eram suscetíveis e 80% resistentes; gentamicina, em que se verificou que 60% dos isolados eram suscetíveis e 40% resistentes;

Para a determinação do perfil de multirresistência dos isolados, procedeu-se à categorização dos antibióticos consoante o seu modo e local de ação na célula bacteriana, como pode ser verificado na tabela 4, tendo como base as definições de MR, XR e PR apresentadas por Magiorakos et al. (2011). Para o estabelecimento de um isolado como não suscetível à ação de um determinado antibiótico consideraram-se os resultados de sensibilidade intermédia e de resistência.

Tabela 4- Caracterização dos resultados dos TSA obtidos para os diferentes isolados com *Pseudomonas* spp. e classificação dos respetivos perfis de multirresistência tendo em conta os distintos modos de ação dos antibióticos utilizados

Modo de ação	Local de ação	AB/ID	1	2	3	4	4.1	4.2	5	5.1	6	7
Inibição da síntese proteica (ISP)	Subunidade 30S do ribossoma	GTM	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S
		TBM	NT	S	S	NT	NT	R	S	I	R	S
		AMC	S	S	NT	NT	NT	R	S	S	NT	S
		ETM	S	R	NT	S	R	R	S	R	NT	NT
		TTC	S	R	R	NT	R	R	R	R	S	R
ISP	Fator alongamento G	ACF	NT	NT	R	NT	NT	R	NT	NT	R	NT
ISP	Subunidade 50S do ribossoma	CLM	NT	NT	NT	NT	NT	R	NT	NT	NT	NT
		CLF	I	R	R	I	R	I	R	R	S	NT
Alteração da estrutura da parede celular	Camada de peptidoglicanos	CFL	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
		CFP	S	S	NT	NT	NT	R	S	S	NT	S
		CFT	R	R	NT	I	S	R	I	S	NT	NT
		CFZ	R	S	NT	NT	NT	R	S	S	NT	S
		AXC	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
		AMP	R	R	NT	R	NT	R	R	R	NT	R
		CBC	R	S	NT	NT	NT	I	R	R	NT	S
		PNC	R	R	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		PPC	NT	S	NT	NT	NT	R	NT	S	NT	S
Inibição da síntese de DNA (ISDNA)	DNA girase e topoisomerase IV	ACN	S	R	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		EFX	S	I	NT	R	R	R	S	R	I	NT
		MFX	NT	NT	NT	NT	NT	I	NT	NT	NT	NT
		OFX	S	S	S	NT	NT	R	S	S	S	S
		CFX	S	S	S	R	NT	R	S	R	S	S
ISDNA	Tetrahydrofolato	SFT	R	R	NT	I	I	R	S	R	NT	R
Perfil de multirresistência			MR	XR	MR	XR	XR	PR	MR	XR	-	MR

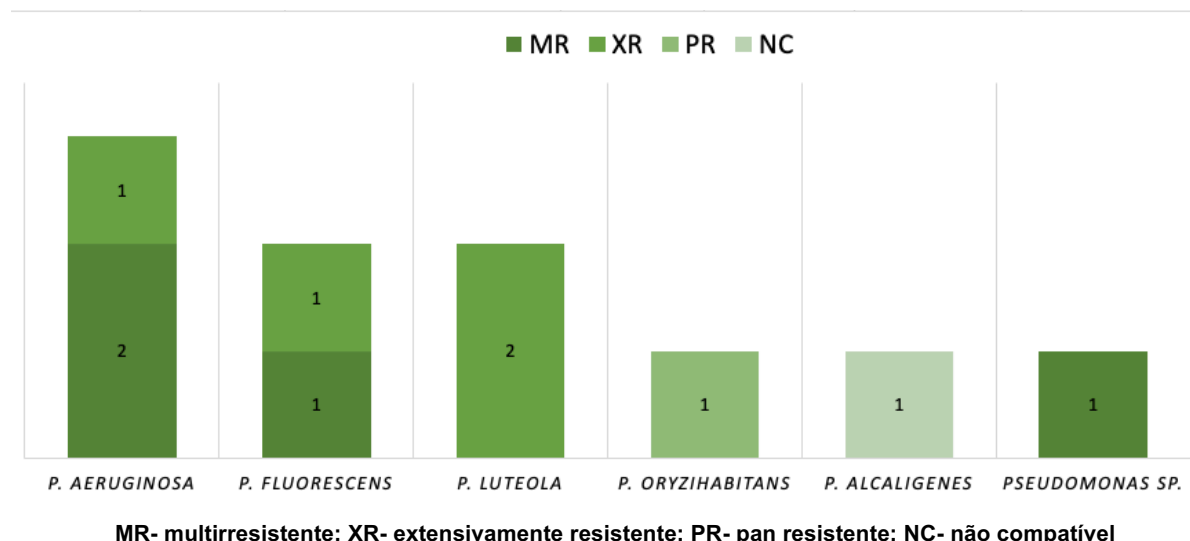
AB- antibióticos utilizados; ID – identificação numérica dos indivíduos com isolamento de *Pseudomonas* spp.; S- sensível; I- intermédio; R- resistente; NT- não testado;

GTM-gentamicina; TBM-tobramicina; AMC-amicacina; ETM-estreptomicina; TTC-tetraciclina; ACF- ácido fusídico; CLM-clindamicina; CLF-cloranfenicol; CFL-cefalexina; CFP-cefoperazona; CFT-cefotaxima; CFZ-ceftazidima; AXC-amoxicilina + ácido clavulânico; AMP-ampicilina; CBC-carbenicilina; PNC-penicilina; PPC-piperacilina; ACN-ácido nalidíxico; EFX-enrofloxacina; MFX-marbofloxacina; OFX-ofloxacina; CFX-ciprofloxacina; SFT-sulfametoxazol + trimetoprim.

Após avaliação dos resultados dos TSA, foi possível verificar que 67% dos isolados de *P. aeruginosa* podem ser classificados como MR e 33% como XR; 50% dos isolados de *P. fluorescens* podem ser classificados como MR e 50% como XR e 100% dos isolados de *P. luteola* podem ser classificados como XR. Quanto às restantes espécies bacterianas presentes em apenas uma amostra, o isolado de *P. oryzihabitans* é compatível com a classificação de PR, o isolado de *Pseudomonas* sp. com a de MR e *P. alcaligenes* não apresentou qualquer perfil de multirresistência.

Nos indivíduos 4 e 5 é, ainda, notório que ao longo do tratamento ocorreu um aumento do perfil de resistência das bactérias isoladas, de extensivamente resistente para pan-resistente no indivíduo 4 e de multirresistente para extensivamente resistente no indivíduo 5.

Gráfico 4- Caracterização dos diferentes perfis de multirresistência das espécies de *Pseudomonas* isoladas



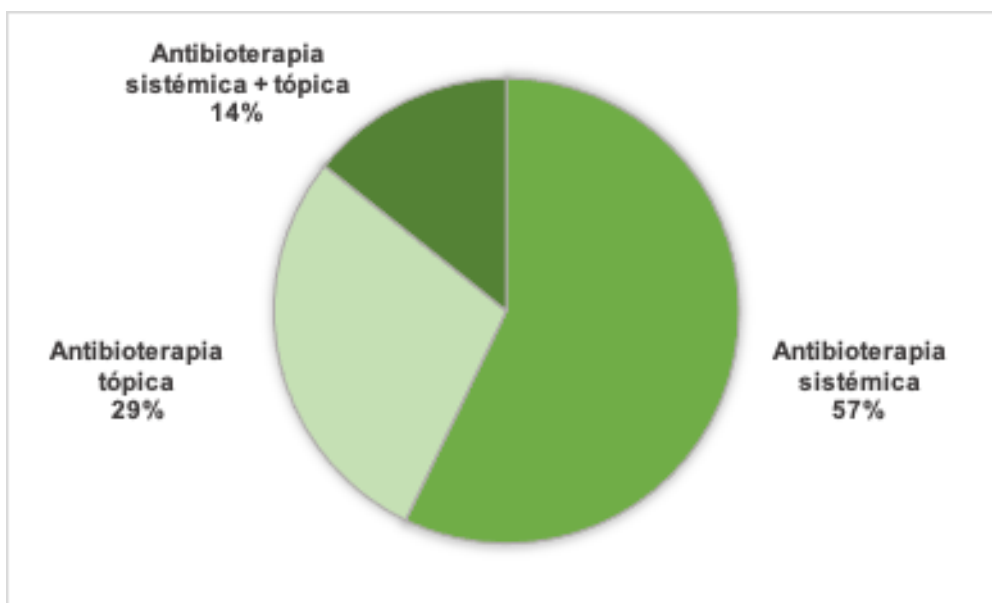
4. Protocolos terapêuticos em répteis com diagnóstico de infecção por *Pseudomonas* spp.

A pesquisa das fichas clínicas dos animais no Guruvet ® permitiu a consulta do protocolo terapêutico aplicado a cada indivíduo, quer do protocolo empírico instituído na consulta, quer da alteração do protocolo após os resultados dos TSA. Nas fichas destes animais não vinha descrita qualquer doença concomitante.

A consulta dos resultados do exame físico dos indivíduos com isolamento deste género bacteriano poderá ser efetuada com recurso ao Anexo II.

Verificou-se que em 71% dos tratamentos empíricos estabelecidos basearam-se em antimicrobianos para os quais os isolados associados à doença demonstraram um perfil de resistência no TSA. Em termos de tratamento empírico, a antibioterapia sistémica foi o protocolo terapêutico mais comum (N=4) , seguido de antibioterapia tópica (N=2) e, por fim, administração conjunta de ambas (N=1).

Gráfico 4- Distribuição dos diferentes protocolos de antibioterapia empírica aplicados em consulta



No caso do indivíduo 4, cujo estímulo iatrogênico foi a presença de úlceras cutâneas disseminadas pelos quatro membros, a terapêutica empírica baseou-se na administração cefazolina. Uma vez que o TSA revelou que o isolado de *P. luteola* era resistente a este antibiótico, o protocolo terapêutico foi alterado para aplicação tópica de gentamicina e terapia via oral de doxiciclina. Na consulta de reavaliação observou-se apenas melhoria ligeira das lesões cutâneas, o que motivou a recolha de uma nova amostra (ID 4.1) e realização de cultura bacteriana e TSA. Foi possível obter um isolado de *P. luteola* resistente à gentamicina, alterando-se então novamente a antibioterapia para aplicação tópica de oxitetraciclina e aplicação intramuscular (IM) de enrofloxacin. Após observação, na consulta de acompanhamento, de perda de peso e dificuldade na movimentação dos membros por parte do réptil, procedeu-se à recolha de uma terceira amostra cutânea (ID 4.2), onde se detetou a presença de *P. oryzihabitans* não suscetível à ação de todos os agentes de todas as categorias de antibióticos testadas, nomeadamente gentamicina, tobramicina, amicacina, estreptomicina, tetraciclina, ácido fusídico, clindamicina, cloranfenicol, cefalexina, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina, carbenicilina, penicilina, piperacilina, ácido nalidíxico, enrofloxacin, marbofloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin e sulfametoxazol combinado com trimetoprima. A antibioterapia foi suspensa, tendo sido substituída por lavagens cutâneas bidárias com iodopovidona diluída em água, numa concentração de 1:10, o que se revelou eficaz no tratamento da infeção durante o acompanhamento clínico, com cicatrização cutânea completa, recuperação de peso e do bom estado geral do animal e na ausência de multiplicação bacteriana a partir da quarta amostra colhida, culminando na alta clínica do animal.

Por sua vez, o indivíduo 5 apresentou-se à consulta com diversos abscessos cutâneos de pequenas dimensões (<1cm) a nível periocular. Após recolha de amostra cutânea e envio para o LMI para realização de cultura bacteriana e TSA, o protocolo empírico recomendado preconizou a aplicação tópica de gentamicina nas lesões. A análise laboratorial permitiu o isolamento de uma bactéria do género *Pseudomonas* sensível à ação deste antibiótico, não se tendo no entanto verificado uma melhoria clínica do animal, tendo ocorrido disseminação das lesões para as comissuras labiais. Consequentemente, o protocolo terapêutico foi alterado para terapia sistémica com enrofloxacina e cefovecina, o que resultou na cicatrização de alguns abscessos, mas na permanência de lesões cutâneas hemorrágicas e de um estado depressivo da tartaruga. Foi recomendado proceder à recolha de uma segunda amostra cutânea (ID 5.1) para análise microbiológica e TSA, que revelou isolamento de *P. fluorescens* resistente à ação da enrofloxacina, tendo-se procedido à alteração da antibioterapia para aplicação tópica de ofloxacina. Este antimicrobiano revelou-se eficaz no tratamento da infeção durante o acompanhamento clínico, com cicatrização cutânea e recuperação do bom estado geral do animal, levando à alta clínica do mesmo.

Os resultados dos TSA dos indivíduos 1, 2, 3, 6 e 7 permitiram o ajuste da antibioterapia para um protocolo que se revelou eficaz no tratamento das infeções.

É importante referir que, tendo em conta o objetivo do presente estudo retrospectivo, este coloca ênfase apenas na antibioterapia aplicada, não referindo fármacos de outras classes ou soluções polivitamínicas incluídos nos protocolos.

Os protocolos de antibioterapia aplicados nos diferentes répteis com isolamento de *Pseudomonas* spp., os resultados dos TSA e a adaptação dos antibióticos consoante os resultados destes testes podem ser consultados na tabela 5.

Tabela 5- Esquematização dos protocolos terapêuticos aplicados, dos resultados dos TSA e da adaptação da terapia consoante estes resultados ao longo do tempo nos ID 4 e 5

ID	Dia 0: Recolha de amostra e antibioterapia empírica	Resultado TSA	Protocolo antibioterapia	Resultado 2º TSA	Protocolo terapêutico	Resultado 3º TSA	Protocolo terapêutico	Resultado 4ºTSA
1	Enrofloxacina IM	Sensível a enrofloxacina	Manutenção da terapia sistémica com enrofloxacina	Alta clínica				
2	Enrofloxacina <i>per os</i>	Sensibilidade intermédia a enrofloxacina	Alteração para terapia <i>per os</i> com ciprofloxacina	Alta clínica				
3	Cloranfenicol tópico	Resistente a cloranfenicol	Alteração para terapia tópica com gentamicina	Alta clínica				
4	Cefazolina IM	Resistente a cefalexina	Alteração para terapia <i>per os</i> com doxiciclina e terapia tópica com gentamicina	Resistente a gentamicina	Alteração para terapia tópica com oxitetraciclina e sistémica com enrofloxacina IM	Resistente ou sensibilidade intermédia a todos os antibióticos testados	Lavagem cutânea com iodopovidona;	Ausência de multiplicação bacteriana; Alta clínica
5	Gentamicina tópica	Sensível a gentamicina mas sem melhoria clínica	Alteração para terapia sistémica com enrofloxacina IM e cefovecina IM	Resistente a enrofloxacina e sensível a cefoperazona	Alteração para terapia tópica com ofloxacina;	Alta clínica		
6	Cefalexina IM e gentamicina tópica	Resistente a cefalexina e e gentamicina	Alteração para terapia <i>per os</i> com amoxicilina+ ácido clavulânico	Alta clínica				
7	Sulfametoxazol + trimetoprim <i>per os</i>	Resistente a sulfametoxazol + trimetoprim	Alteração para terapia <i>per os</i> com ciprofloxacina	Alta clínica				

1 **CAPÍTULO V – Discussão**

2 **1. Caracterização da amostra**

3 A amostra incluída no presente estudo era composta por um total de 24 répteis, a partir
4 dos quais foram obtidas 29 amostras que foram enviadas para análise no LMI da FMV -
5 ULisboa, entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2020. Não foi possível o isolamento bacteriano a
6 partir de 2 destas amostras (7%) sendo que uma foi colhida a partir de um réptil sujeito a
7 antibioterapia prévia. Este valor é inferior ao relatado por Cushing et al. (2011), que justifica a
8 ausência de multiplicação bacteriana em 17,6% das amostras testadas com a possibilidade
9 de antibioterapia prévia, erros de colheita e colheita de amostras em zonas do corpo com uma
10 população bacteriana particularmente elevada, o que poderá levar ao consumo de todos os
11 recursos do meio de cultura e na morte dos microrganismos. A ausência de multiplicação
12 bacteriana pode indicar a inexistência de uma infeção bacteriana.

13 Segundo os relatórios das análises bacteriológicas, 59% das amostras foram obtidas
14 a partir de animais com infeções monobacterianas e 41% de animais com infeções
15 polimicrobianas. No presente estudo, a diversidade bacteriana das amostras foi avaliada
16 através de métodos bacteriológicos convencionais muito utilizados globalmente devido ao
17 baixo custo, consistindo na propagação bacteriana em 3 meios distintos e isolamento do(s)
18 potencial(ais) agente(s) patogénico(s), previamente identificados, em cultura pura. No
19 entanto, diversos autores têm afirmado que esta abordagem tradicional tem diversas
20 limitações, principalmente devido à reduzida capacidade de determinadas populações
21 bacterianas naturais se multiplicarem num meio artificial restritivo (Fry 2000; Kaeberlein et al.
22 2002; Rodríguez-Valera 2002). Comparativamente à aplicação de métodos moleculares e
23 genómicos, os métodos standard baseados em cultura detetam apenas 1 a 10% das espécies
24 bacterianas presentes em grande parte dos nichos ecológicos (Divers e Stahl 2019). Para
25 além disso, a seleção por parte do técnico de laboratório do(s) potencial(ais) agente(s)
26 patogénico(s) associado(s) a infeção no animal poderá ser subjetiva e sujeita a erro devido à
27 inexistência de informação acerca da microbiota comensal de diversas espécies de répteis
28 (Cushing et al. 2011). Estes fatores podem afetar negativamente os resultados do estudo ao
29 contribuírem para uma subavaliação dos agentes envolvidos no processo de doença. No
30 entanto, os meios convencionais são, ainda, os recomendados, uma vez que a obtenção dos
31 isolados em cultura é essencial para a realização do TSA após identificação.

32 De acordo com a origem anatómica das amostras analisadas, 62% eram de origem
33 cutânea, 28% de origem oral e 10% de origem ocular. Num estudo retrospectivo semelhante
34 levado a cabo por Cushing et al. (2011), num laboratório do Reino Unido, as amostras mais

1 prevalentes também eram de origem cutânea, oral e, ainda, respiratória, com uma
2 preponderância de 24%, 22% e 22%, respetivamente; foram ainda descritas amostras com
3 origem em abscessos (14%), ocular (7,5%), interna (4%), articular (1,5%), óssea (1%) e
4 desconhecida (4%). Isto pode dever-se ao facto deste laboratório ser independente e
5 especializado no diagnóstico de amostras provenientes de animais exóticos, o que contribui
6 para a amostra ser bastante superior (N=251) e mais diversificada.

7 A população em estudo era composta por 19 quelónios (79%), 3 sáurios (13%) e 2
8 ofídios (8%). Estes valores são muito variáveis entre estudos (Ebani et al. 2008; Cushing et
9 al. 2011) podendo ser afetados por fatores como a natureza independente ou não do
10 laboratório e, por isso, da quantidade e variedade de amostras recebidas, a preferência por
11 manter animais exóticos como animais de estimação no país onde é conduzido o estudo e,
12 também, a predileção por determinadas espécies de répteis nessas mesmas zonas. Um
13 estudo revelou que o principal motivo para a adoção de um réptil como animal de estimação
14 é a singularidade destes animais (Klaphake e Smith 2002).

15 A totalidade dos répteis em estudo eram inteiros no momento de apresentação à
16 consulta. No caso desta classe de animais, a reprodução em cativeiro é encorajada com o
17 intuito de diminuir a pressão da importação de espécies selvagens (Mader 1996) e a
18 esterilização é, geralmente, apenas recomendada na presença de distúrbios reprodutivos
19 (Divers e Stahl 2019). Um inquérito realizado por Klaphake e Smith (2002) numa clínica
20 veterinária com atendimento exclusivo a animais exóticos no Utah concluiu que somente 0,9%
21 dos tutores tinham interesse em esterilizar os seus animais, sendo que nenhum destes era
22 tutor de répteis; concluiu, ainda, que cerca de 68% dos tutores tinham um orçamento máximo
23 que pretendiam gastar em despesas médico-veterinárias, o que pode resultar numa baixa
24 prevalência desta cirurgia por motivos eletivos.

25 Após análise das fichas clínicas, concluiu-se que praticamente metade (46%) destes
26 animais se apresentou à consulta no HEV no período da primavera, 25% apresentou-se no
27 período do verão, 21% no outono e apenas 8% no inverno, sendo que pode ter havido
28 influência da sazonalidade nos resultados. Diversas atividades essenciais para a
29 sobrevivência dos répteis estão intimamente ligadas à manutenção de uma temperatura
30 corporal correta (Cowles e Bogert 1944) e a criação de microclimas adequados dentro das
31 instalações permite aos animais a regulação da sua temperatura corporal e das perdas
32 cutâneas de água (Divers e Stahl 2019). Como tal, a ausência de uma fonte de calor nas
33 instalações irá afetar a resposta imunitária do animal (Elkand e Cooper 1980), sendo este
34 efeito mais notório nos meses de inverno, em que a temperatura ambiente é, obviamente,
35 mais baixa (Divers e Stahl 2019). Para além disso, são observadas variações sazonais no
36 timo dos répteis, que sofre regressão durante o inverno (Jaffredo et al. 2006), o que em
37 conjunto com um mau maneio, poderá tornar estes animais mais suscetíveis ao

1 desenvolvimento de infeções neste período (Divers e Stahl 2019). No entanto, a menor taxa
2 de análises bacteriológicas realizadas a partir de répteis nos meses frios pode indicar uma
3 menor afluência destes animais ao HEV, o que seria de esperar, uma vez que corresponde
4 ao seu período de hibernação e, portanto, de inatividade. Por sua vez, o pico de análises
5 realizadas na primavera poderá ser justificado pelo despertar dos animais do estado de
6 hibernação, em que se acredita ocorrer o aumento da sua temperatura corporal e
7 consequente aumento exponencial da multiplicação de agentes infecciosos e parasitários. Esta
8 multiplicação pode ocorrer a um ritmo superior ao do aumento da resposta imunitária do réptil
9 (Divers e Stahl 2019), tornando-o mais vulnerável ao desenvolvimento de doenças e exibição
10 de alterações comportamentais e sinais clínicos que poderão ser um estímulo iatrogénico.

11

12 **2. Isolamento e identificação de *Pseudomonas* spp.**

13 Verificou-se uma frequência de isolamento de *Pseudomonas* spp. de 35%, sendo que
14 este é um valor semelhante ao verificado por Ebani et al. (2008), num estudo realizado em
15 répteis saudáveis em cativeiro (37%). Esta bactéria já foi identificada em diversas amostras
16 provenientes de diferentes espécies de répteis sem sinais de doença, o que parece sugerir
17 que esta espécie faz parte da microbiota comensal destes animais (Taddei et al. 2010; Di
18 Ianni et al. 2015). Noutro estudo, Colinon et al. (2010) verificaram que 96% das amostras a
19 partir das quais houve isolamento de *P. aeruginosa* tinham origem fecal ou na cloaca, tendo
20 sido possível isolar esta espécie a partir de amostras colhidas a partir do mesmo indivíduo em
21 períodos de tempo distintos, o que sugere a sua capacidade de adaptação às condições do
22 trato gastrointestinal de ofídios em cativeiro. Apesar de estarem presentes em indivíduos
23 saudáveis, sendo agentes oportunistas, estão envolvidos em diversas doenças em répteis
24 (Ebani e Fratini 2005).

25 A partir das amostras analisadas, foi possível identificar 5 espécies diferentes de
26 *Pseudomonas*, sendo que relativamente à amostra 5 apenas foi possível a identificação do
27 isolado obtido até ao género bacteriano. As frequências de isolamento das diferentes espécies
28 foram de 10% para *P. aeruginosa*, 7% para *P. fluorescens* e *P. luteola* e 3% para *P.*
29 *oryzihabitans* e *P. alcaligenes*. Estes valores são muito variáveis entre os diversos estudos
30 disponíveis, mas num estudo que englobava répteis com sinais de doença e apresentados a
31 consulta em CAMV realizado por Cushing et al. (2010), foi obtida uma frequência de
32 isolamento de *P. aeruginosa* semelhante (7,94%).

33 O isolamento e identificação das espécies foram realizados, ao longo dos anos,
34 recorrendo a métodos bacteriológicos baseados na proliferação bacteriana em 3 meios
35 distintos, seguidos do isolamento do(s) potencial(ais) agente(s) patogénico(s) em cultura pura
36 e, por fim, na identificação bacteriana através da inoculação de galerias de identificação

1 bioquímica. Estes métodos têm algumas limitações inerentes, já enunciadas anteriormente,
2 sendo também importante referir que as galerias de identificação bioquímica utilizadas no LMI
3 foram desenvolvidas com o objetivo de identificar isolados de origem humana, o que poderá
4 influenciar os resultados obtidos. De facto, nos indivíduos a partir dos quais foi realizada
5 colheita repetida de amostras ao longo do acompanhamento clínico no HEV verificou-se o
6 isolamento de diferentes espécies de *Pseudomonas*. No indivíduo 4 foi identificada
7 *Pseudomonas luteola* a partir das primeiras duas amostras e *Pseudomonas oryzihabitans* a
8 partir da terceira amostra; no indivíduo 5, foi possível isolar *Pseudomonas* sp. a partir da
9 primeira amostra e *Pseudomonas fluorescens* a partir da segunda. Assim sendo, poderia ter
10 sido realizada a caracterização genética destes isolados, não só para confirmar a identificação
11 de espécie obtida através das galerias API NE, mas também para confirmar se se poderia
12 tratar da mesma estirpe, havendo assim persistência após o tratamento, ou se a estirpe
13 isolada seria resultado de uma nova infeção.

14 *Pseudomonas* spp. foi o género isolado mais frequentemente em amostras orais (38%)
15 e oculares (67%), sendo o segundo mais comum em amostras cutâneas (15%). A instalação
16 e as condições higiénico-sanitárias em que estes animais se encontram são fatores
17 determinantes na saúde de répteis em cativeiro. Em animais doentes com um estilo de vida
18 aquático, anfíbio ou terrestre, existe uma predominância de bactérias de Gram-negativo
19 aeróbias em zonas do corpo em contacto direto com o ambiente exterior, provavelmente
20 devido ao contacto com as fezes dos animais ou com a presença destas bactérias no
21 ambiente (Elkan e Cooper 1980; Taddei et al. 2010; Di Ianni et al. 2015). Assim, o isolamento
22 mais frequente de *Pseudomonas* spp. a partir de répteis com acesso a ambiente aquático
23 (57%) seria, portanto, expectável uma vez que estes animais estão muitas vezes expostos a
24 pequenos volumes de água propícios à proliferação desta espécie bacteriana (Di Ianni et al.
25 2015). A manutenção de répteis em alojamentos individuais, arejados e com exposição solar
26 que permita a termorregulação é necessária para a garantia da saúde do animal (Ferreira
27 Junior et al. 2009).

28 As amostras a partir das quais foi possível proceder ao isolamento de *Pseudomonas*
29 spp foram associadas a infeções polimicrobianas (70%) e monobacterianas (30%). Tal como
30 foi referido anteriormente, devido à utilização de métodos bacteriológicos baseados em
31 cultura estes valores devem ser interpretados com prudência. No entanto, já era esperado um
32 maior número de infeções polimicrobianas uma vez que bactérias do género *Pseudomonas*
33 são altamente adaptáveis e ubíquitas e expressam mecanismos específicos que lhes
34 permitem interagir com outras bactérias através da síntese de moléculas sinalizadoras,
35 denominadas autoindutores, que lhes permitem formar e sobreviver em comunidades multi-
36 espécie ao coordenarem a sua atividade em grupo (Tashiro et al. 2013).

1 Estas bactérias são agentes oportunistas, necessitando de uma quebra prévia do
2 sistema imunitário do hospedeiro para o desenvolvimento de infecção (Quinn et al. 2011). Nas
3 fichas clínicas dos répteis que referem o isolamento de *Pseudomonas* spp. não estavam
4 descritas quaisquer doenças concomitantes, o que pode indicar que o estado de
5 imunossupressão dos animais estaria associado a situações de stress, a maior causa de
6 desenvolvimento de infecções bacterianas nestes animais (Ferreira Junior et al. 2009). Assim
7 sendo, teria sido importante averiguar em consulta qual o papel do stress na fisiologia das
8 doenças diagnosticadas através da avaliação de diversos parâmetros como o comportamento
9 do animal, alterações no funcionamento do sistema nervoso autónomo (SNA), resposta
10 neuroendócrina e resposta imune (Martínez Silvestre 2014).

11 Houve isolamento de *Pseudomonas* spp. a partir de amostras de 7 répteis, sendo este
12 grupo constituído por 4 quelónios (57%), 2 sáurios (29%) e 1 ofídio (14%). Tal como já foi
13 referido, estes valores são muito variáveis entre os estudos publicados, podendo ser afetados
14 pela natureza do laboratório responsável pelos resultados das análises incluídas no estudo
15 ou pela preferência de determinadas espécies de répteis em diferentes áreas geográficas.

16 Após aplicação do modelo estatístico de regressão logística não foi encontrada
17 nenhuma associação estatisticamente significativa entre o isolamento de *Pseudomonas* spp.
18 e a idade, género e espécie dos animais, assim como o tipo de doença diagnosticado em
19 contexto de consulta. Estes resultados poderão ter sido afetados pelo fraco poder da amostra
20 em estudo (N=24).

21 A idade média de animais com isolamento de *Pseudomonas* era de 106,9 meses,
22 cerca de 9 anos, ligeiramente inferior à idade média de 121, 5 meses, cerca de 10 anos, obtida
23 para a totalidade da amostra em estudo. Em répteis, os efeitos específicos do envelhecimento
24 no sistema imunitário não estão amplamente descritos e os estudos disponíveis apresentam
25 resultados ambíguos. Ujvari e Madsen (2011) observaram a diminuição do título de anticorpos
26 humorais com o aumento da idade em pítons de água (*Liasis fuscus*) e Plasma et al. (2019)
27 verificaram a existência de imunosenescência em lagartos da espécie *Crotaphytus*
28 *dickersonae*. Contrariamente, Zimmermam et al. (2013) não relataram alterações na
29 imunidade humoral em tartarugas da Flórida com o aumento da idade. Por outro lado, um
30 estudo com tartarugas do deserto da espécie *Gopherus polyphemus* encontrou uma
31 correlação positiva entre a idade dos animais e o número de espécies bacterianas
32 observadas, concluindo que existia uma maior diversidade bacteriana em indivíduos adultos,
33 quando comparada com indivíduos jovens (Yuan et al. 2015). São necessários mais estudos
34 que visem esclarecer a existência ou não de uma associação entre estas variáveis.

35 Este grupo de animais era constituído por 57% de machos e 43% de fêmeas, enquanto
36 a totalidade da amostra em estudo era constituída por um número mais elevado de fêmeas
37 (54%) que machos (46%). Não foi observada uma associação estatisticamente relevante

1 entre o isolamento de *Pseudomonas* spp. e o género dos animais; contudo, sabe-se que este
2 é um dos fatores que afeta a resposta imune em répteis devido à influência de corticosteróides
3 endógenos variáveis entre os géneros, como a testosterona e a hidrocortisona, que sofrem
4 um aumento duradouro durante o outono/inverno, o que resulta num estado de
5 imunossupressão dos animais. Assim sendo, a sazonalidade tem efeitos distintos entre os
6 dois géneros, sendo que os machos apresentam níveis de testosterona mais elevados e
7 respostas imunes menos vigorosas (Jaffredo et al. 2006).

8 Observou-se a presença do género bacteriano em estudo em indivíduos das espécies
9 *Trachemys scripta*, *Eublepharis macularius*, *Chamaleo calyptratus*, *Mauremys leprosa* e
10 *Thamnophis eques scotti* e também em tartarugas anfíbias. Para efeitos estatísticos e
11 descritivos, teria sido importante determinar, em consulta, a espécie exata dos indivíduos
12 designados nas fichas clínicas como tartarugas anfíbias. Dado a pouca disponibilidade de
13 estudos acerca da microbiota comensal de diversas espécies de répteis, a informação
14 disponível acerca da frequência de isolamento de *Pseudomonas* spp. nestes animais é
15 também muito escassa e pouco conclusiva, pelo que são necessários mais estudos nesta
16 área.

17 Quanto ao tipo de doença, verificou-se uma predominância de doença oftalmológica
18 (43%), seguida de doença dermatológica (28,5%) e respiratória (28,5%) em animais a partir
19 dos quais foi possível isolar *Pseudomonas* spp. Diversas espécies de *Pseudomonas* estão
20 descritas como agentes infecciosos comuns associados a epidermites/dermatites, estomatites,
21 pneumonias, osteomielites/artrites, otites internas e quadros de septicémia em quelónios. Em
22 sáurios e ofídios estão associadas a estomatites, abscessos cutâneos, dermatites,
23 pneumonias, enterites, hepatites, osteomielites, uveítes e conjuntivites (Isaza e Jacobson
24 2013). No entanto, é necessário ter em conta que este género inclui agentes oportunistas e
25 que pode, portanto, ser responsável por diversas doenças consoante o órgão ou sistema de
26 órgãos afetados e a capacidade de resposta do sistema imunitário do hospedeiro.

27

28 **3. Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)**

29 O perfil de suscetibilidade dos isolados identificados como *Pseudomonas* spp. foi
30 determinado, entre Abril de 2006 e Fevereiro de 2020, utilizando 23 antibióticos em
31 combinações diferentes. A grande variedade de agentes utilizados ao longo dos anos poder-
32 se-á dever, principalmente, à adaptação do protocolo ao diagnóstico de infeções
33 polimicrobianas, uma vez que é habitual testar os mesmos antibióticos para avaliar a
34 suscetibilidade dos diferentes géneros bacterianos presentes na amostra; à adaptação da
35 escolha dos antimicrobianos a testar consoante a origem anatómica das amostras; ou, ainda,
36 à escolha dos fármacos para o TSA pelo clínico do HEV. Esta grande diversidade impossibilita

1 a determinação do perfil de suscetibilidade dos isolados relativamente à totalidade dos
2 antibióticos aplicados.

3 Contudo, a avaliação da suscetibilidade a 3 antibióticos foi realizada em todos os
4 isolados: cefalexina, relativamente à qual 100% dos isolados não foram suscetíveis à sua
5 ação; amoxicilina com ácido clavulânico, tendo-se verificado que 20% dos isolados eram
6 suscetíveis e 80% não suscetíveis a este antimicrobiano; e gentamicina, antibiótico
7 relativamente ao qual 60% dos isolados se revelaram suscetíveis e 40% resistentes. Há
8 poucos estudos disponíveis que tenham incluído cefalexina no protocolo de TSA para
9 *Pseudomonas* spp. em répteis; no entanto, um estudo por Foti et al. (2013) refere uma taxa
10 de não suscetibilidade relativamente a 78,3% dos isolados analisados. Para amoxicilina com
11 ácido clavulânico, Foti et al. (2013) verificaram um valor de não suscetibilidade inferior (70%),
12 Tang et al. (2020) obtiveram um valor semelhante (86%), enquanto Ebani et al. (2008)
13 registaram que 100% dos isolados incluídos no seu estudo não eram suscetíveis à ação desta
14 combinação antibiótica. A gentamicina foi, em todos os estudos, um dos antibióticos com
15 maiores taxas de suscetibilidade (Ebani et al. 2008; Foti et al. 2013; Tang et al. 2020).

16 Estas variações são esperadas entre os diversos estudos devido às diferentes
17 características inerentes dos mesmos. Dois deles correspondiam a estudos experimentais e
18 o outro a um estudo retrospectivo; a população em estudo variou entre répteis subclínicos, ou
19 seja, com ausência de sinais clínicos, e répteis apresentados a consulta num hospital escolar
20 veterinário; a natureza anatómica das amostras enviadas foi diferente, sendo que cada um
21 dos estudos se foca ou em amostras de diversas origens, ou unicamente em amostras fecais
22 ou em amostras orais; a temperatura utilizada nas análises bacteriológicas também variou
23 entre os 30°C e os 37°C; por fim, dois dos estudos utilizaram as normas do CLSI para
24 interpretação dos resultados dos TSA, o que está em concordância com as utilizadas no
25 presente estudo, enquanto o outro utiliza as normas publicadas pela Oxoid, o que trará,
26 inevitavelmente, algum grau de desconformidade na comparação dos resultados publicados
27 por cada um (Ebani et al. 2008; Foti et al. 2013; Tang et al. 2020).

28 Poderia ainda ter sido calculada a concentração mínima inibitória (CMI) dos
29 antibióticos testados, uma vez que, apesar dos TSA fornecerem informação importante acerca
30 da sensibilidade *in vitro* dos isolados, os resultados nem sempre se refletem *in vivo*. Por sua
31 vez, a determinação da CMI garante um conhecimento mais objetivo e quantitativo do perfil
32 de suscetibilidade (Hernandez-Divers et al. 2017).

33 Da amostra em estudo, é possível concluir que 67% dos isolados de *P. aeruginosa*
34 podem ser classificados como MR e 33% como XR; 50% dos isolados de *P. fluorescens*
35 podem ser classificados como MR e 50% como XR e 100% dos isolados de *P. luteola* podem
36 ser classificados como XR (Magiorakos et al. 2011). Quanto às restantes espécies bacterianas
37 presentes em apenas uma amostra, *P. oryzihabitans* é compatível com a classificação de PR,

1 *Pseudomonas* sp. com a de MR e *P. alcaligenes* não compatível com qualquer perfil de
2 multirresistência. Esta categorização foi baseada na publicação de Magiorakos et al. (2011);
3 contudo, foi necessário fazer uma adaptação das definições estabelecidas neste estudo de
4 2011 dado que não foi utilizada a totalidade do conjunto de antibióticos sugeridos pelos
5 autores, o que seria de esperar, uma vez que as análises bacteriológicas levadas a cabo no
6 LMI pretendem auxiliar a escolha do protocolo terapêutico mais apropriado e não proceder à
7 caracterização do perfil de multirresistência dos isolados.

8 A informação acerca do perfil de multirresistência de isolados de *Pseudomonas* spp.
9 obtidos a partir de répteis é muito escassa. Em medicina humana, tem sido descrito um
10 aumento da presença de BLLE e carbapenemas em *P. aeruginosa*, associado a um
11 aumento de isolados classificados como MR, que chegam a atingir prevalências entre 15% e
12 30% em inúmeras zonas do mundo. Para além disso, uma proporção preocupante destes
13 isolados são, também, compatíveis com os critérios de XR (Oliver et al. 2015). Um estudo que
14 se focou na análise de isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir de doentes com bacteriemia
15 em Espanha concluiu que 28% eram MR e 52% XR (Oliver et al. 2015), o que reforça a
16 importância de investigação futura deste tema não só em medicina de répteis, como em todas
17 as áreas da medicina veterinária, sobretudo em bactérias zoonóticas como *Pseudomonas*,
18 com o objetivo de contribuir para a manutenção da saúde das pessoas, dos animais e do
19 ambiente.

20 Nos indivíduos 4 e 5 foi observado um aumento do perfil de resistência dos isolados
21 ao longo dos tratamentos realizados no HEV. Isto pode sugerir o desenvolvimento de
22 mecanismos envolvidos em processos de resistência adquirida e adaptativa. Apenas foram
23 analisados os resultados dos TSA obtidos para as diferentes espécies de *Pseudomonas*
24 identificadas, tendo sido excluídos da base de dados os resultados de quaisquer outras
25 espécies isoladas a partir de amostras correspondentes a infeções polimicrobianas. Contudo,
26 não pode ser ignorada a possibilidade da transferência horizontal de genes associados a
27 antibiorresistência entre diferentes isolados estar na origem deste aumento (Azam e Khan
28 2019). Tem sido descrita a relação entre a ocorrência de mutações em genes cromossomais
29 e a expressão de mecanismos de resistência aos antimicrobianos como, por exemplo,
30 aumento da ação das bombas de efluxo ou mutação dos locais alvo na célula bacteriana
31 envolvidos no mecanismo dos antibióticos e, conseqüentemente, permeabilidade reduzida a
32 estes agentes (Azam e Khan 2019). As bactérias deste género têm, também, a capacidade
33 de alterar o seu estilo de vida e adaptar a expressão de fatores de virulência de acordo com
34 o ecossistema em que se encontram (Tümmler e Klockgether 2017), devido em grande parte
35 à elevada presença de genes regulatórios no seu genoma, em comparação com outras
36 espécies bacterianas (Drenkard 2003).

37

1 **4. Protocolos terapêuticos em répteis com diagnóstico de infecção por**

2 ***Pseudomonas* spp.**

3 No presente estudo retrospectivo, observou-se que enquanto se aguardava pelos
4 resultados das análises bacteriológicas foram administrados antibióticos, por diversas vias, a
5 todos os animais a partir dos quais foi possível isolar *Pseudomonas* spp. (Anexo I). Encontra-
6 se descrito que o uso de antimicrobianos deve ter como base uma forte suspeita de infecção
7 bacteriana primária ou de envolvimento bacteriano secundário e que diversos fatores devem
8 ser tidos em conta na escolha do tratamento empírico, principalmente os agentes infecciosos
9 mais prevalentes em infecções em répteis e o espectro de ação dos diversos agentes
10 antimicrobianos (Isaza and Jacobson 2013; Hernandez-Divers et al. 2017; Broens e van
11 Geijlswijk 2018). É ainda importante o clínico ter conhecimento da farmacocinética específica
12 para aquela espécie animal ou, caso não existam estudos disponíveis, para uma espécie
13 semelhante (Gibbons 2014). Está, também, recomendado reservar a administração empírica
14 de antibióticos para casos clínicos em que outra opção não seja viável, como a aplicação de
15 biocidas tópicos, e em que o atraso do início da antibioterapia comprometa o bem-estar do
16 animal (Broens e van Geijlswijk 2018).

17 Concluiu-se que 71% tratamentos empíricos utilizados não se revelaram eficazes, uma
18 vez que os isolados não eram suscetíveis à ação dos antibióticos administrados. A falta de
19 estudos e, portanto, de disponibilidade de informação sobre protocolos de antibioterapia
20 nestes animais dificulta a concretização de um plano de antibioterapia eficaz (Tang et al.
21 2020). É importante referir que este é um grupo de vertebrados muito heterogéneo, com uma
22 grande diversidade de espécies, com características anatómicas e fisiológicas únicas e com
23 poucas características pré-adaptativas à vida em cativeiro e ao contacto com o Homem, o que
24 faz com que a segurança durante a contenção influencie a escolha do fármaco e da via de
25 administração (Isaza e Jacobson 2013; Warwick et al. 2013).

26 Os antibióticos utilizados nos protocolos empíricos aplicados nos animais em estudo
27 foram sulfametoxazol com trimetoprima, gentamicina cefazolina, cefalexina enrofloxacina e
28 cloranfenicol. De acordo com a política de administração antibiótica desenvolvida pelo Serviço
29 de Medicina Zoológica do Hospital Escolar Veterinário da Universidade de Georgia, Estados
30 Unidos da América, combinações de sulfonamidas e trimetoprima, aminoglicosídeos e
31 cefalosporinas de 1ª geração são considerados como primeira linha de tratamento e de
32 recurso útil enquanto se aguarda pelos resultados das análises bacterianas. Por sua vez, de
33 acordo com o estudo supramencionado, o uso de fluoroquinolonas de 2ª geração e
34 cloranfenicol só deve ser considerado após obtenção dos resultados do TSA (Hernandez-
35 Divers et al. 2017; BSAVA 2020). Os resultados obtidos por Tang et al. (2020) estão em
36 concordância com esta norma, ao concluírem que sulfametoxazol em combinação com

1 trimetroprima, aminoglicosídeos, penicilinas básicas como ampicilina ou tetraciclina como
2 doxiciclina eram boas opções para tratamento empírico em répteis com suspeita de infecção
3 por bactérias de Gram-negativo. No entanto, o protocolo terapêutico deve ser adaptado a
4 cada caso e ter em conta a disponibilidade e formulações dos diferentes agentes.

5 A enrofloxacinina foi prescrita aos indivíduos 1 e 2, que apresentavam doença
6 respiratória e oftalmológica, respetivamente. No caso do primeiro indivíduo este protocolo
7 revelou-se eficaz com suscetibilidade do isolado à sua ação e cura clínica do animal. No caso
8 do segundo animal, o isolado revelou-se não suscetível à sua ação. De acordo com a literatura
9 consultada, como fármaco de primeira escolha alternativo poderia ter sido utilizada
10 gentamicina tópica (Isaza e Jacobson 2013; Divers e Stahl 2019; BSAVA 2020). Contudo, em
11 Portugal não há nenhuma formulação deste agente licenciada para répteis (MedVet 2015), o
12 que tornaria necessário extrapolação da dose a administrar a partir das doses recomendadas
13 para cães e gatos.

14 O cloranfenicol foi administrado ao indivíduo 3, que apresentava doença oftalmológica,
15 sendo que no TSA o isolado se revelou não suscetível à sua ação. Perante este resultado, o
16 clínico alterou o protocolo para terapia tópica com gentamicina. Este antibiótico também
17 poderia ter sido utilizado alternativamente ao cloranfenicol como fármaco de primeira escolha
18 (Isaza e Jacobson 2013; Divers e Stahl 2019; BSAVA 2020), apesar de ser necessário
19 proceder à extrapolação da dose.

20 A via de administração sistémica foi a mais utilizada (57%), seguida da via tópica
21 (29%) e, por fim, da utilização conjunta de antibioterapia sistémica e tópica (14%). A escolha
22 da via é um processo muito importante em répteis, visto que estes animais têm diversas
23 características únicas que influenciam a farmacocinética dos antimicrobianos e,
24 consequentemente, a resposta ao tratamento (Isaza e Jacobson 2013). No caso do indivíduo
25 5, ocorreu a prescrição empírica de gentamicina tópica e, após chegada dos resultados do
26 TSA, concluiu-se que o isolado era sensível a este agente. No entanto, não se observou
27 melhoria clínica do animal, o que pode ter diversas causas. Os répteis com infeções
28 bacterianas tendem a desenvolver exsudados sólidos no interior de lesões granulomatosas
29 discretas, o que pode afetar a penetração dos antimicrobianos (Isaza e Jacobson 2013).
30 Sendo animais poiquilotérmicos, a temperatura ambiente em que o réptil é mantido pode
31 afetar diretamente a farmacocinética dos agentes (Divers e Stahl 2019). Um estudo com
32 tartarugas da espécie *Gopherus polyphemus* revelou que a duração da ação da amicacina
33 era muito inferior em tartarugas mantidas a 30°C, quando comparada com as tartarugas
34 mantidas a 20°C (Caligiuri et al. 1990). Outra causa possível do insucesso da antibioterapia
35 aplicada é a falta de cooperação dos tutores ou o não seguimento das recomendações do
36 clínico.

1 Está descrito que, em determinados casos, a terapia local com um biocida ou
2 antibiótico pode ser igualmente ou até mais eficaz que terapia sistémica (Divers e Stahl 2019).
3 No caso do indivíduo 4, diagnosticado com doença dermatológica, foi possível observar um
4 aumento do perfil de resistência dos isolados obtidos a partir de amostras recolhidas ao longo
5 do tratamento, sendo que o último isolado identificado, *P. oryzihabitans*, não era suscetível a
6 todos os antibióticos testados, verificando-se igualmente um agravamento do estado geral do
7 animal. Deste modo, o clínico recomendou lavagens bidárias com iodopovidona, o que se
8 revelou o único protocolo eficaz, permitindo cicatrização cutânea completa, recuperação do
9 bom estado geral do animal e ausência de multiplicação bacteriana a partir da quarta amostra
10 cutânea colhida. A descrição deste caso poderá, então, demonstrar a eficácia da aplicação
11 de biocidas tópicos em afeções cutâneas em répteis e sugerir a utilização empírica destes
12 agentes microbianos como uma opção válida, enquanto se aguarda pelos resultados dos TSA.

13 **5. Limitações do presente estudo retrospectivo transversal**

14 As principais limitações deste estudo prendem-se com a sua natureza retrospectiva,
15 que teve por base a análise da base de dados do LMI e, posteriormente, das fichas clínicas
16 dos animais incluídos no estudo, o que resultou numa população de 24 répteis. Assim, não
17 foi possível a observação direta dos animais e o contacto com os tutores para recolha de
18 quaisquer informações adicionais, ausentes no historial clínico consultado. Esta população
19 corresponde a um baixo poder de amostra em estatística inferencial, o que justifica o carácter
20 maioritariamente descritivo deste trabalho.

21 O elevado intervalo de tempo abrangido, de cerca de 14 anos, pode afetar os
22 resultados uma que vez terá ocorrido, indubitavelmente, atualização quer dos conhecimentos
23 herpetológicos, quer da medicina dos animais exóticos. Para além disso, a grande diversidade
24 de antibióticos utilizados para identificar o perfil de suscetibilidade dos isolados obtidos a partir
25 dos répteis impossibilita a determinação do perfil de suscetibilidade relativamente à totalidade
26 dos antibióticos aplicados.

27 Os resultados poderão ainda ser afetados por variações individuais no diagnóstico e
28 tratamento dos répteis, visto que foram avaliados por clínicos diferentes.

29
30
31
32

1 **CAPÍTULO VI – Conclusão**

2 A reduzida literatura existente não só sobre a prevalência de infeções por
3 *Pseudomonas* spp. em répteis e as suas características, mas também sobre a microbiota
4 comensal de diversas espécies destes animais, torna clara a necessidade de mais estudos
5 acerca da interação entre seres procariontas e a classe Reptilia.

6 Não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o isolamento
7 deste género bacteriano e características dos répteis, como idade, género e espécie. O
8 mesmo foi verificado com o tipo de doença diagnosticado em consulta. Estes resultados
9 poderão ter sido afetados pelo fraco poder da amostra (N=24).

10 Este estudo contribui para a expansão do conhecimento deste tema na realidade de
11 Lisboa, cidade base do Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULisboa. Os perfis de
12 multirresistência obtidos são preocupantes, uma vez que os isolados se revelaram não
13 suscetíveis à ação de diversos antibióticos utilizados frequentemente na medicina de répteis.
14 Assim sendo, é essencial, numa perspetiva futura, a padronização específica dos protocolos
15 dos testes de sensibilidade a antibióticos para amostras colhidas a partir de répteis, de
16 maneira a poder tirar conclusões alargadas à totalidade dos antimicrobianos testados e
17 garantir que os agentes usados estão adaptados à realidade clínica quotidiana. O cálculo da
18 concentração mínima inibitória para quantificação da suscetibilidade antimicrobiana é,
19 também, recomendada.

20 Os resultados supramencionados alertam também para a imprescindibilidade da
21 criação de uma política de administração de antibióticos em répteis, com uma hierarquização
22 dos agentes, de maneira a garantir uma prescrição segura e universal.

23 A eficácia do tratamento de uma infeção cutânea grave causada por *Pseudomonas*
24 sp. não suscetível a todos os antibióticos utilizados, através da aplicação de um antisséptico
25 tópico, pode sugerir que esta abordagem seja válida noutros casos clínicos e uma opção
26 adequada para tratamento empírico enquanto se aguarda pelos resultados do TSA ou do
27 cálculo da CMI.

28
29
30
31
32
33
34
35

1 Bibliografia

- 2 Abrahamian FM, Goldstein EJC. 2011. Microbiology of animal bite wound infections.
3 Clin Microbiol Rev. 24(2):231–246. doi:10.1128/CMR.00041-10.
4
- 5 Azam MW, Khan AU. 2019. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas*
6 *aeruginosa*. Drug Discov Today. 24(1):350–359. doi:10.1016/j.drudis.2018.07.003.
7
- 8 Bennasar A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. 2010. PseudoMLSA: A database for
9 multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. BMC Microbiol. 10. doi:10.1186/1471-
10 2180-10-118.
11
- 12 Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. Molecular
13 mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 13(1):42–51.
14 doi:10.1038/nrmicro3380.
15
- 16 Bonnet X, Fizesan A, Michel CL. 2013. Shelter availability, stress level and digestive
17 performance in the aspik viper. J Exp Biol. 216(5):815–822. doi:10.1242/jeb.078501.
18
- 19 Brindhadevi K, Oscar L F, Mylonakis E, Shanmugam S, Verma TN, Pugazhendhi A.
20 2020. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*.
21 Process Biochem. 96:49–57. doi:10.1016/j.procbio.2020.06.001.
22
- 23 Broens EM, van Geijlswijk IM. 2018. Prudent Use of Antimicrobials in Exotic Animal
24 Medicine. Vet Clin North Am - Exot Anim Pract. 21(2):341–353.
25 doi:10.1016/j.cvex.2018.01.014.
26
- 27 BSAVA. 2020. BSAVA Small Animal Formulary, Part B: Exotic Pets. 10th Edition.
28 Quedgeley: Hedley J, editor.
29
- 30 Bucior I, Tran C, Engel J. 2014. Assessing *Pseudomonas* Virulence Using Host Cells.
31 Chapter 57. In: *Pseudomonas* Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology (Filloux,
32 Alain e Ramos, Juan-Luis). 1149:741–755.
33
- 34 Caligiuri R, Kollias G V., Jacobson E, McNab B, Clark CH, Wilson RC. 1990. The effects
35 of ambient temperature on amikacin pharmacokinetics in gopher tortoises. J Vet Pharmacol
36 Ther. 13(3):287–291. doi:10.1111/j.1365-2885.1990.tb00778.x.

1
2 Chen CM, Wu KG, Chen CJ, Wang CM. 2011. Bacterial infection in association with
3 snakebite: A 10-year experience in a northern Taiwan medical center. *J Microbiol Immunol*
4 *Infect.* 44(6):456–460. doi:10.1016/j.jmii.2011.04.011.
5
6 CLSI. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests;
7 Approved Standard — Tenth Edition. 32(1): 1-13.
8
9 Colinon C, Jocktane D, Brothier E, Rossolini GM, Cournoyer B, Nazaret S. 2010.
10 Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence
11 of high interand intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environ*
12 *Microbiol.* 12(3):716–729. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02115.x.
13
14 Cowles RB, Bogert CM. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert
15 reptiles. *Bulletin of the AMNH.* [Internet]. [acedido em 2020 Set 18]. 83(5):261–296.
16
17 Cushing A, Pinborough M, Stanford M. 2011. Review of bacterial and fungal culture
18 and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *Vet Rec.*
19 169(15):390. doi:10.1136/vr.d4636.
20
21 Dehghani R, Sharif MR, Moniri R, Sharif A, Kashani HH. 2016. The identification of
22 bacterial flora in oral cavity of snakes. *Comp Clin Path.* 25(2):279–283. doi:10.1007/s00580-
23 015-2178-9.
24
25 Di Ianni F, Dodi PL, Cabassi CS, Pelizzone I, Sala A, Cavarani S, Parmigiani E,
26 Quintavalla F, Taddei S. 2015. Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and
27 tortoises. *BMC Vet Res.* 11(1). doi:10.1186/s12917-015-0405-x.
28
29 Divers SJ, Stahl SJ. 2019. *Mader’s Reptile and Amphibian Medicine and Surgery.* Third
30 Edit. [place unknown]: ELSEVIER.
31
32 Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.
33 *Microbes Infect.* 5(13):1213–1219. doi:10.1016/j.micinf.2003.08.009.
34
35 Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment
36 of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 67(3):351–368. doi:10.2165/00003495-
37 200767030-00003.

1
2 Ebani VV, Fratini F. 2005. Bacterial zoonoses among domestic reptiles. Ann della Fac
3 di Med Vet. . [Internet]. [acedido em 2020 Ago 30]. (1): 85-91. <http://eprints.adm.unipi.it/185/>
4
5 Ebani V V., Fratini F, Ampola M, Rizzo E, Cerri D, Andreani E. 2008. *Pseudomonas*
6 and *Aeromonas* isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro
7 sensitivity. Vet Res Commun. 32:195–198. doi:10.1007/s11259-008-9160-9.
8
9 Elkan E, Cooper E. 1980. Skin biology of reptiles and amphibians. Proc of R Soc of Ed.
10 79(1-3):115-125. doi:10.1017/S0269727000010368.
11
12 Ferreira Junior RS, Siqueira AK, Campagner M V., Salerno T, Soares TCS, Lucheis
13 SB, Paes AC, Barraviera B. 2009. Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus*
14 *durissus terrificus*) microbiota. Pesqui Vet Bras. 29(12):999–1003. doi:10.1590/S0100-
15 736X2009001200008.
16
17 Foti M, Giacobello C, Fisichella V, Latella G. 2013. Multidrug-Resistant *Pseudomonas*
18 *aeruginosa* Isolates From Captive Reptiles. J Exot Pet Med. 22(3):270–274.
19 doi:10.1053/j.jepm.2013.08.007.
20
21 Fry J. 2000. Bacterial diversity and “unculturables”. Microbiol Today [Internet].
22 [atualizado em 2000 Nov; acedido em 2020 Nov 1]. 27:186–188.
23 https://socgenmicrobiol.org.uk/pubs/micro_today/pdf/110008.pdf
24
25 Garg A, Sujatha S, Garg J, Acharya NS, Parija SC. 2009. Wound infections secondary
26 to snakebite. J Infect Dev Ctries. 3(3):221–223. doi:10.3855/jidc.39.
27
28 Gasink LB, Fishman NO, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Lautenbach E. 2006.
29 Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk Factors and
30 Clinical Impact. Am J Med. 119(6):19–25. doi:10.1016/j.amjmed.2005.11.029.
31
32 Gibbons PM. 2014. Advances in reptile clinical therapeutics. J Exot Pet Med. 23(1):21–
33 38. doi:10.1053/j.jepm.2013.11.007.
34
35
36

1 Gómez Alvarez C, Leal Castro A, Pérez de González M de, Navarrete Jiménez M.
2 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entiendo a un peligroso
3 enemigo. Rev Fac Med [Internet]. [atualizado em 2005 Jan 1; acedido em 2020 Nov 1].
4 53(1):27-34. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/43484>
5
6 Granato ET, Harrison F, Kümmerli R, Ross-Gillespie A. 2016. Do bacterial “virulence
7 factors” always increase virulence? A meta-analysis of pyoverdine production in
8 *Pseudomonas aeruginosa* as a test case. Front Microbiol. 7:1–13.
9 doi:10.3389/fmicb.2016.01952.
10
11 Hall BG, Barlow M. 2005. Revised Ambler classification of β -lactamases. J Antimicrob
12 Chemother. 55(6):1050–1051. doi:10.1093/jac/dki130.
13
14 Hartsell SC, Madsen TE. 2013. Non-Snake Reptile Bites. In: Emergency Medicine.
15 Second Edi. Elsevier Inc. p. 1211-1215.e1. doi: 10.1016/B978-1-4377-3548-2.00141-5.
16
17 Hauser AR. 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection
18 by injection. Nat Rev Microbiol. 7(9):654–665. doi:10.1038/nrmicro2199.
19
20 Hernandez-Divers SJ, Sladakovic I, Mayer J, Sanchez S. 2017. Development of an
21 antibiotic policy in a zoological medicine service and approach to antibiotic dosing using MIC
22 data. 2nd Int Conf Avian, Herpetol Exot Mammal Med; 25-31 Mar 2017; Veneza, Itália: AEMV
23 And ARAV 2017 Proceedings. p. 36-44.
24
25 Hesse C, Schulz F, Bull CT, Shaffer BT, Yan Q, Shapiro N, Hassan KA, Varghese N,
26 Elbourne LDH, Paulsen IT, et al. 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas*
27 spp. Environ Microbiol. 20(6):2142–2159. doi:10.1111/1462-2920.14130.
28
29 Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author
30 Information. Am Soc Microbiol [Internet]. [acedido em 2020 Dez 3]. p. 1-23.
31 <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>.
32
33 Isaza R, Jacobson ER. 2013. Antimicrobial Drug Use in Reptiles. In: Giguere, S;
34 Prescott, J F; Dowling, P M, editors. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine 5th Edition:
35 Wiley Blackwell. p. 623–636.
36
37

1 Jacobson ER. 2007. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles. 1st Edit. [place
2 unknown]: CRC Press.
3

4 Jaffredo T, Fellah JS, Dunon D. 2006. Immunology of Birds and Reptiles. *Encycl Life*
5 *Sci.*:1–11. doi:10.1038/npg.els.0000521.
6

7 Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretling B. 2000. Molecular mechanisms of
8 fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.
9 *Antimicrob Agents Chemother.* 44(3):710–712. doi:10.1128/AAC.44.3.710-712.2000.
10

11 Jones RN. 1998. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in
12 hospital- based pathogens: The Amp C enzymes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 31(3):461–466.
13 doi:10.1016/S0732-8893(98)00029-7.
14

15 Kaeberlein T, Lewis K, Epstein SS. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in
16 pure culture in a simulated natural environment. *Science* (80-). 296(5570):1127–1129.
17 doi:10.1126/science.1070633.
18

19 Kerr KG, Snelling AM. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present
20 adversary. *J Hosp Infect.* 73(4):338–344. doi:10.1016/j.jhin.2009.04.020.
21

22 Klaphake EA, Smith JL. 2002. An initial assessment of exotic-animal pet owners in
23 Utah: A survey with special emphasis on personal characteristics and expenditure tendencies.
24 *J Avian Med Surg.* 16(2):115–122. doi:10.1647/1082-6742(2002)016[0115:AIAOEA]2.0.CO;2.
25

26 Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. 2005. Use of an efflux
27 pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone
28 resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents*
29 *Chemother.* 49(2):565–570. doi:10.1128/AAC.49.2.565-570.2005.
30

31 Lalucat J, Mulet M, Gomila M, García-Valdés E. 2020. Genomics in bacterial taxonomy:
32 Impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes* (Basel). 11(2):1–18. doi:10.3390/genes11020139.
33

34 Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance
35 in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 28(2):337–418. doi:10.1128/CMR.00117-14.
36

1 Li Z, Nair SK. 2012. Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and
2 synchronize their response to external signals? *Protein Sci.* 21(10):1403–1417.
3 doi:10.1002/pro.2132.
4

5 Liu GY, Nizet V. 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends*
6 *Microbiol.* 17(9):406–413. doi:10.1016/j.tim.2009.06.006.
7

8 Mader DR. 1996. Reproductive surgery in the green iguana. *Semin Avian Exot Pet*
9 *Med.* 5(4):214–221. doi:10.1016/s1055-937x(96)80030-2.
10

11 Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth
12 S, Hindler JF. 2011. Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions
13 for Acquired Resistance. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
14

15 Maillard J. 2005. Antimicrobial biocides in the healthcare environment : efficacy , usage,
16 policies , and perceived problems. *Thera and Clinic R Manag* [Internet]. [acedido em 2020 Dez
17 3]. 1(4):307–320. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1661639/>
18

19 Maillard JY, Messenger S, Veillon R. 1998. Antimicrobial efficacy of biocides tested on
20 skin using an *ex-vivo* test. *J Hosp Infect.* 40(4):313–323. doi:10.1016/S0195-6701(98)90309-
21 7.
22

23 Martínez Silvestre A. 2014. How to assess stress in reptiles. *J Exot Pet Med.*
24 23(3):240–243. doi:10.1053/j.jepm.2014.06.004.
25

26 Medvet [Internet]. 2015. [place unknown]: DGAV; [atualizado em 2015 Maio; acedido
27 em 2020 Nov 30]. <https://medvet.dgav.pt/>
28

29 Modesto SP, Anderson JS. 2004. The phylogenetic definition of reptilia. *Syst Biol.*
30 53(5):815–821. doi:10.1080/10635150490503026.
31

32 Montgomery JM, Gillespie D, Sastrawan P, Fredeking TM, Stewart GL. 2002. Aerobic
33 salivary bacteria in wild and captive Komodo dragons. *J Wildl Dis.* 38(3):545–551.
34 doi:10.7589/0090-3558-38.3.545.
35

1 Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. 2015. The increasing threat of
2 *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat. 21–22:41–59.
3 doi:10.1016/j.drug.2015.08.002.
4

5 Palleroni NJ. 1981. Introduction to the Family *Pseudomonadaceae*. In: Starr, M P;
6 Heinz, S.; Trüper, H G; Balows, A.; Shlegel, H G, editors. The Prokaryotes. [place unknown]:
7 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1:655–665. doi:10.1007/978-3-662-13187-9_58.
8

9 Paola D, Acevedo L, Caycedo M, Leal D, Iriarte G. 2018. Uso de biocidas y
10 mecanismos de respuesta bacteriana. Rev Cub Inv Bio [Internet]. [accedido em 2020 Nov 3].
11 37(3):1–17. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v37n3/ibi14318.pdf>.
12

13 Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N. 2008. Introducing reptiles into a captive
14 collection: The role of the veterinarian. Vet J. 175(1):53–68. doi:10.1016/j.tvjl.2006.12.009.
15

16 Pasmans F, Hellebuyck T, Martel A, Bogaerts S, Braeckman J, Cunningham AA,
17 Griffiths RA, Sparreboom M, Schmidt BR. 2017. Future of keeping pet reptiles and amphibians:
18 Towards integrating animal welfare, human health and environmental sustainability. Vet Rec.
19 181(17):450. doi:10.1136/vr.104296.
20

21 Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. 2018. The current status on the taxonomy
22 of *Pseudomonas* revisited: An update. Infect Genet Evol. 57:106–116.
23 doi:10.1016/j.meegid.2017.10.026. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>.
24

25 Poole K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob
26 Agents Chemother. 49(2):479–487. doi:10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.
27

28 Poole K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. Front Microbiol. 2:1–
29 13. doi:10.3389/fmicb.2011.00065.
30

31 Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. 2011.
32 Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2nd Edit. Oxford: Wiley-Blackwell.
33

34 Rajendran NB, Muters NT, Marasca G, Conti M, Sifakis F, Vuong C, Voss A, Baño JR,
35 Tacconelli E. 2019. Mandatory surveillance and outbreaks reporting of the WHO priority
36 pathogens for research & discovery of new antibiotics in European countries. Clin Microbiol
37 Infect. 26:943.e1-943.e6. doi:10.1016/j.cmi.2019.11.020.

1
2 Rasko DA, Sperandio V. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated
3 disease. *Nat Rev Drug Discov.* 9(2):117–128. doi:10.1038/nrd3013.
4
5 Rios FM, Zimmerman LM. 2015. Immunology of Reptiles. eLS.:1–7.
6 doi:10.1002/9780470015902.a0026260.
7
8 Rodríguez-Valera F. 2002. Approaches to prokaryotic biodiversity: A population
9 genetics perspective. *Environ Microbiol.* 4(11):628–633. doi:10.1046/j.1462-
10 2920.2002.00354.x.
11
12 Russell AD. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: Present knowledge and future
13 problems. *J Hosp Infect.* 43(1):57–68. doi:10.1016/S0195-6701(99)90066-X.
14
15 Taddei S, Dodi PL, Di Ianni F, Cabassi CS, Cavirani S. 2010. Conjunctival flora of
16 clinically normal captive green iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Rec.* 167(1):29–30.
17 doi:10.1136/vr.b4868.
18
19 Tam VH, Schilling AN, Vo G, Kabbara S, Kwa AL, Wiederhold NP, Lewis RE, Tam VH,
20 Schilling AN, Schilling AN, et al. 2005. Pharmacodynamics of Polymyxin B against
21 *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbio.* 49(9):3624–3630. doi:10.1128/AAC.49.9.3624.
22
23 Tang PK, Divers SJ, Sanchez S. 2020. Antimicrobial susceptibility patterns for aerobic
24 bacteria isolated from reptilian samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory: 129
25 cases (2005–2016). *J Am Vet Med Assoc.* 257(3):305–312. doi:10.2460/javma.257.3.305.
26
27 Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. 2013. Interspecies
28 interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ.*
29 28(1):13–24. doi:10.1264/jsme2.ME12167.
30
31 Tehrani H, Tejero-Trujeque R, Dhital SK. 2008. Septic arthritis due to a Savannah
32 Monitor lizard bite: A case report. *J Hand Surg Eur Vol.* 33(6):810.
33 doi:10.1177/1753193408092495.
34
35 Thomas L, Russell AD, Maillard JY. 2005. Antimicrobial activity of chlorhexidine
36 diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to
37 biocide residues. *J Appl Microbiol.* 98(3):533–543. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02402.x.

1 Thomas N, Brook I. 2011. Animal bite-associated infections: Microbiology and
2 treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 9(2):215–226. doi:10.1586/eri.10.162.
3

4 Tingley R, Meiri S, Chapple DG. 2016. Addressing knowledge gaps in reptile
5 conservation. *Biol Conserv.* 204:1–5. doi:10.1016/j.biocon.2016.07.021.
6

7 Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. 2006. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing
8 Systems of the 21st Century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(2):296–316.
9 doi:10.1128/mmbr.00048-05.
10

11 Tümmler B, Klockgether J. 2017. Recent advances in understanding *Pseudomonas*
12 *aeruginosa* as a pathogen. *F1000 R.* 6(0). doi:10.12688/f1000research.10506.1.
13

14 Tveten AK, Riborg A, Vadseth HT. 2013. DGGE identification of microorganisms
15 associated with *Borrelia burgdorferi* sensu lato- or *Anaplasma phagocytophilum* -infected
16 *Ixodes ricinus* ticks from northwest Norway. *Int J Microbiol.* Vol. 2013 (805456):10-18.
17 doi:10.1155/2013/805456.
18

19 Uetz P. 2000. How many reptile species? *Herpetol Ver* [Internet]. [place unknown]:
20 Society for the Study of Amphibians and Reptiles; [acedido em 2020 Ago 29]. 31(1):13–15.
21 [https://search.proquest.com/openview/ae07247b2bed0a88847e4679b874ca44/1?pq-](https://search.proquest.com/openview/ae07247b2bed0a88847e4679b874ca44/1?pq-origsite=gscholar&cbl=33457)
22 [origsite=gscholar&cbl=33457](https://search.proquest.com/openview/ae07247b2bed0a88847e4679b874ca44/1?pq-origsite=gscholar&cbl=33457)
23

24 Visca P, Imperi F, Lamont IL. 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to
25 biosignificance. *Trends Microbiol.* 15(1):22–30. doi:10.1016/j.tim.2006.11.004.
26

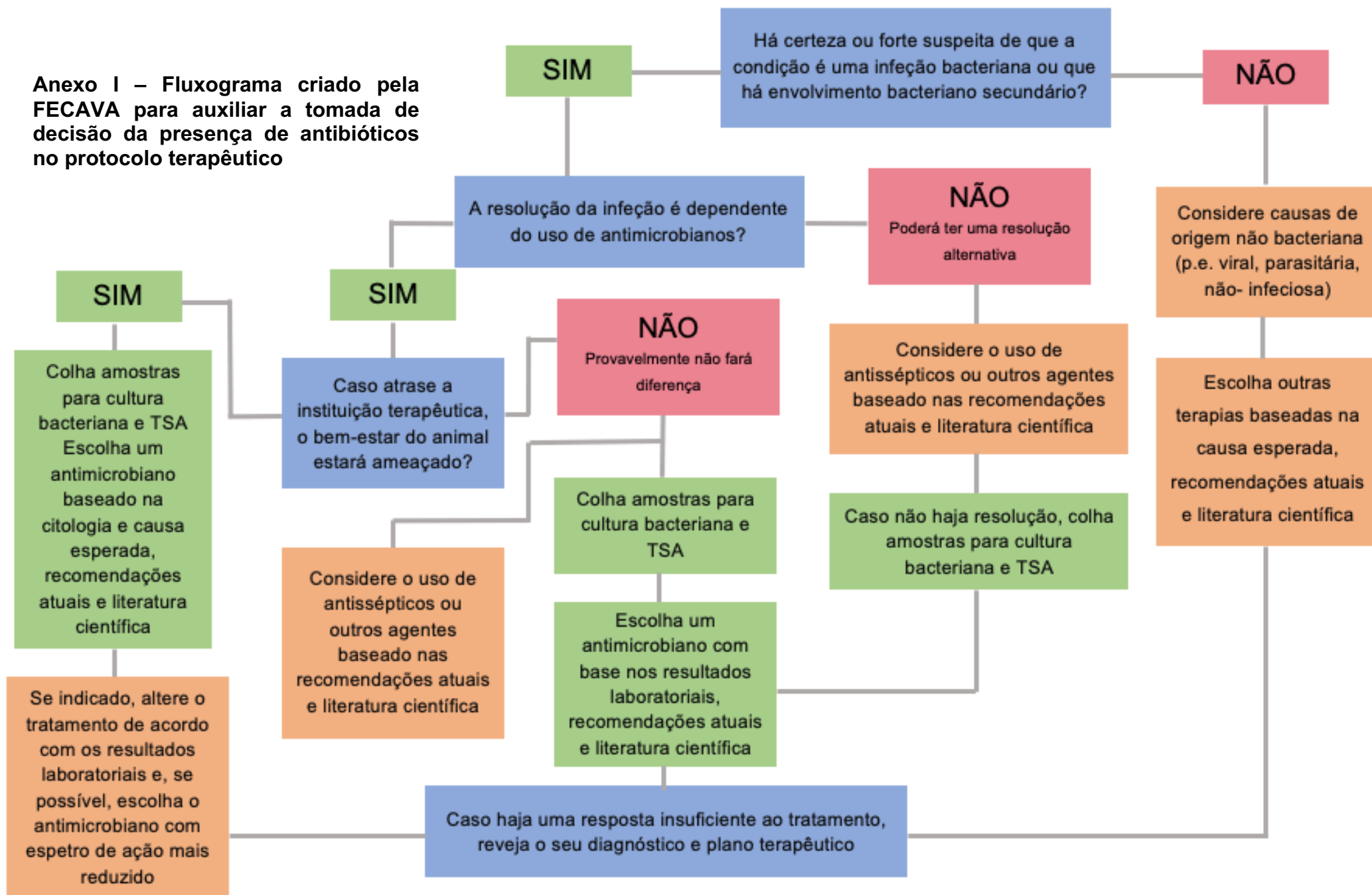
27 Warwick C, Arena P, Lindley S, Jessop M, Steedman C. 2013. Assessing reptile
28 welfare using behavioural criteria. *In Pract.* 35(3):123–131. doi:10.1136/inp.f1197.
29

30 WHO. 2018. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine - 6th revision
31 [Internet]. [acedido em 2020 Dez 5].
32 [http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendeley.](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendeley)
33

34 Willey J, Sherwood L, Woolverton C. 2010. Control of Microorganisms in the
35 Environment, chapter 8; Antimicrobial Chemotherapy, chapter 9; Proteobacteria, chapter 22.
36 In: Prescott ' s Microbiology. 10th Edit. New York: McGraw Hill Edu.

1 Williams DL, Jackson R. 2016. Availability of Information on Reptile Health and Welfare
2 from Stores Selling Reptiles. *Open J Vet Med.* 6(3):59–67. doi:10.4236/ojvm.2016.63007.
3
4 Winslow C, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. 1916.
5 The Families and Genera of the Bacteria. *J Bacteriol.* 5(3):191-229. doi:10.1128/JB.5.3.191-
6 229.1920.
7
8 Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG, Paster BJ, Madigan MT, Fowler VJ, Hahn
9 CM, Blanz P, Gupta R, Nealson KH. 1984. The phylogeny of purple bacteria: The alpha
10 subdivision. *Syst Appl Microbiol.* 5(3):315–326. doi:10.1016/S0723-2020(84)80034-X.
11
12 Yuan ML, Dean SH, Longo A V, Rothermel BB, Tuberville TD, Zamudio KR. 2015.
13 Kinship, inbreeding and fine-scale spatial structure influence gut microbiota in a hindgut-
14 fermenting tortoise. *Mol Ecol.* 24(10):2521–2536. doi:10.1111/mec.13169.
15

Anexo I – Fluxograma criado pela FECAVA para auxiliar a tomada de decisão da presença de antibióticos no protocolo terapêutico



Anexo II – Descrição do exame físico dos 7 animais a partir dos quais foram obtidos isolados de *Pseudomonas* spp.

ID	Espécie animal	Estímulo iatrotópico	Exame físico da primeira consulta no HEV	Antibioterapia empírica
1	<i>Trachemys scripta</i>	Anorexia	Expulsão de secreção de aparência purulenta da cavidade oral; Diagnóstico de pneumonia após interpretação de exame radiográfico efetuado em contexto de consulta.	Enrofloxacina IM
2	<i>Eublepharis macularius</i>	Oftalmológico	Depressão do olho direito e presença de uma película esbranquiçada.	Enrofloxacina <i>per os</i>
3	<i>Chamaeleo calyptratus</i>	Oftalmológico	Presença de um nódulo no olho esquerdo; animal aparenta estar invisual e adota comportamentos de automutilação da cauda.	Cloranfenicol tópico
4	Tartaruga anfíbia	Dermatológico	Úlceras cutâneas grave disseminadas nos quatro membros; sem alterações na palpação celômica; boa condição corporal; hidratação normal.	Cefazolina IM
5	Tartaruga anfíbia	Dermatológico	Presença de diversos abscessos cutâneos de pequenas dimensões (<1cm) a nível periocular; boa condição corporal; hidratação normal.	Gentamicina tópica
6	<i>Mauremys leprosa</i>	Oftalmológico	Exoftalmia unilateral esquerda com panoftalmite e blefarite; drenagem de exsudado fétido.	Cefalexina IM e gentamicina tópica
7	<i>Thamnothis eques scotti</i>	Respiratório	Dificuldades respiratórias;	Sulfametoxazol + trimetoprima <i>per os</i>