

GONÇALO MENDES FERNANDES

**DETEÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM – NEGATIVAS
NA FLORA ORAL E FECAL EM GECKOS LEOPARDO
(*EUBLEPHARIS MACULARIUS*)**

Orientadora: Professora Doutora Adriana Belas

Co-orientador: Professor Doutor Rui Patrício

Versão Definitiva

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

GONÇALO MENDES FERNANDES

**DETEÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS
NA FLORA ORAL E FECAL EM GECKOS
LEOPARDO (*EUBLEPHARIS MACULARIUS*)**

Versão Definitiva

Dissertação defendida para a obtenção do Grau
de Mestre em Medicina Veterinária no curso de
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
conferido pela Universidade Lusófona
no dia 08/02/2024

Com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Mariana Batista

Arguente: Proessora Doutora Andreia Valença

Orientadora: Professora Doutora Adriana Belas

Co-orientador: Professor Doutor. Rui Patrício

Despacho N° 578 /2024

Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

Gostava de primeiramente agradecer á professora doutora Adriana Belas por desde sempre acreditar neste projeto e desde o primeiro dia ter mostrado um grande interesse em ajudar-me e ser minha orientadora, fazendo sempre tudo para me ajudar ao máximo, mesmo sem nunca ter ouvido falar na espécie até eu ter mostrado uma foto no dia que pedi para ser minha orientadora.

Ao professor Dr. Rui Patrício por tudo, pelo apoio, companheirismo, amizade, jantares e principalmente por tudo o que me ensinou ao longo destes anos, e claro por aceitar fazer parte do projeto.

Muito obrigado a toda a equipa do hospital Animales Exoticos 24h, por todas as oportunidades que me deram, por tudo o que me ensinaram e por toda a simpatia e companheirismo com o que fizeram, e principalmente ao Pablo por todos os conhecimentos que me transmitiu e por toda a sua boa disposição.

A toda a minha família, aos meus pais por estarem lá sempre para mim e me ajudarem e apoiarem a realizar todos os meus sonhos, são os melhores, e também por desde sempre me deixarem ter mil e um animais em casa desde escaravelhos e caracóis a geckos e sapos, e assim o sonho foi crescendo.

Á minha namorada por ser a melhor pessoa que poderia ter ao meu lado, por me ter acompanhado ao longo de todo o curso e por ser o meu grande apoio, nos bons e nos maus momentos, e em todas as loucuras e ideias de arranjar novos animais para a coleção.

Aos meus gatos por serem os melhores e mais fofos por todos os ronrons, cabeçadas e fornecimento de calor no inverno quando se sentem ao colo, e principalmente ao Garfield por ter sido o melhor gatinho do mundo.

A todos os meus repteis e sapos por serem os grandes impulsionadores desta paixão, e principalmente ao Zara por ser o gecko mais carinhoso e o melhor cão com escamas do mundo.

Aos meus melhores amigos Castro e BD, por ao longo destes vários anos serem sempre um grande apoio, e por todas as aventuras, momentos e histórias que temos para contar.

A todos os meus afilhados, amigos da faculdade e da praxe por toda a ajuda ao longo destes 6 anos, por todos os risos, memorias, aprendizagens e vida académica incrível, este curso,

como dizemos inúmeras vezes, não se faz sozinho. Em especial ao meu parceiro Joaquim, por toda a importância que teve, e por se ter tornado muito mais que um simples amigo de faculdade.

A todos os meus outros amigos desde antes da faculdade, por todas as memórias e momentos que continuamos e continuaremos a viver juntos, que mesmo cada um seguindo o seu caminho na faculdade, nunca nada mudou e não deixamos de nos ver e combinar coisas.

Aos meus mestres de Taekwondo e jiu-jitsu por todas as aprendizagens dentro e fora do tatami, em especial ao mestre César por todo o reconhecimento que tem por mim.

A todos os colegas criadores e apaixonados por reptéis que aceitaram entrar neste trabalho.

Resumo

A informação disponível sobre o papel dos geckos leopardo como possíveis transmissores e portadores de bactérias zoonóticas, tanto a nível nacional como internacional é limitada. Os objetivos deste estudo foram avaliar a frequência de bactérias Gram-negativas zoonóticas em geckos leopardo saudáveis e caracterizar as suas resistências antimicrobianas.

De novembro de 2022 até fevereiro de 2023, foram recolhidas zaragatoas orais (n=49) e cloacais (n=43) de geckos leopardo saudáveis (n=56) provenientes de diferentes criadores/tutores na área de Lisboa, Portugal. A identificação das bactérias Gram-negativas foi realizada por VITEK® MS e por reação em cadeia de polimerase (PCR). Os testes de sensibilidade a antibióticos foram realizados por método de difusão de disco, seguindo as guidelines da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os genes das β -lactamases foram confirmados por PCR.

Neste estudo, as bactérias Gram-negativas da cavidade oral e cloacal mais frequentes pertenciam á ordem Enterobacterales, sendo principalmente, *Salmonella* spp. (22,4% e 60,5%, respetivamente) e *Citrobacter freudi* (4,1% e 16,3%, respetivamente), na ordem Pseudomonadales destacam-se *Pseudomonas aeruginosa* (22,4% e 18,6%, respetivamente)

Diferentes serotipos de *Salmonella* spp. foram identificadas incluindo ser. Thyphimurium e ser. Tennessee. Cerca de 20% das Enterobacterales identificadas foram resistentes às cefalosporinas de terceira-geração. Os isolados de *C. freudi* apresentavam o gene *bla*_{CMY}. Um isolado de *K. pneumoniae* era multirresistente e apresentava os genes *bla*_{CTX-M-1group}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}.

Os resultados deste estudo demonstraram que os geckos leopardo podem transportar e transmitir bactérias zoonóticas e multirresistentes para humanos e animais de outras espécies, e por esse motivo, deve se ter sempre cuidados e precauções quando em contacto com estes animais.

Palavras-chave: flora oral, flora cloacal, bactéria multirresistente, gecko leopardo, gram-negativa

Abstract

Limited information is available on the role of leopard geckos as possible transmitters and carriers of zoonotic bacteria, both nationally and internationally. This study aimed to assess the frequency of zoonotic gram-negative bacteria of healthy Leopard geckos and characterize antimicrobial resistance.

From November 2022 until February 2023, oral cavity (n=49) and cloacal (n=43) swab samples from healthy leopard Geckos (n=56) were collected from different breeders/owners from Lisbon area, Portugal. Gram-negative bacteria identification was performed by VITEK® MS and by Polymerase chain reaction. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion method following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. β -lactamase genes were confirmed by PCR.

In this study, the most frequent Gram-negative bacteria from oral cavity and cloacal samples belong to the order Enterobacterales, in particular *Salmonella* spp. (22,4% and 60,5%, respectively) and *Citrobacter freundii* (4.1% and 16.3%, respectively), in the Pseudomonadales order, *Pseudomonas aeruginosa* stands out (22.4% and 18.6%, respectively).

Different serovars of *Salmonella* spp. were identified, including ser. Thyphimurium and ser. Tennessee. About 20% of the Enterobacterales identified were resistant to third generation cephalosporins. *C. freundii* isolates harbored the *bla*_{CMY} gene. One *K. pneumoniae* isolate was MDR and harboured the *bla*_{CTX-M-1group}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes.

The results of this study showed that Leopard geckos may act as carriers of zoonotic and multiresistant bacteria for humans and other animal species, therefore caution should be exercised in the handling and contact with these animals.

Keywords: oral flora, cloacal flora, multiresistant bacteria, leopard gecko, gram-negative

Lista de Abreviaturas

AmpC - Cefalosporinas

APEC - *E. coli* patogénica para aves

AEIC - *E. coli* invasiva aderente

AK - Amicacina

AMC - Amoxicilina/ácido clavulânico

AMP – Ampicilina

Bp – pares de base

CP – Carbapenemases

C3G - Cefalosporinas de terceira geração

C1G - Cefalosporinas de primeira geração

CIM - Método da determinação da concentração inibitória mínima

CAZ - Ceftazidima

CIP -Ciprofloxacina

CN - Gentamicina

CTX - Cefotaxima

CSLI – “Clinical and Laboratory Standards Institute”

DAEC - *E. coli* difusamente aderente

ESBLs - Beta-lactamases de espectro alargado

Et al. - E outros, da locução latina “et alli”

EPEC - *E. coli* enteropatogénica

ETEC - *E. coli* enterotoxigénica

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

EAEC - *E. coli* enteroagregativa
ExPEC - Estirpes patogénicas extraintestinais de *E. coli*
EnPEC - *E. coli* endometrial patogénica
EUCAST – “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
FEP - Cefepime
FOX - Cefoxitina
IPEC - Estirpes patogénicas intestinais de *E. coli*
LEV - Levofloxacina
MDR - Bactérias multi-resistentes
MDD - Método de difusão em disco
NMEC - *E. coli* associada à meningite neonatal
PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase chain reaction
PRL - Piperacilina
R – Resistente
Rpm – Rotações por minuto
SePEC - *E. coli* septicémica
SAR - Salmonelose associada a répteis
SAREE - Salmonelose associada a répteis de estimação exóticos
Spp – espécies, da locução latina “species pluralis”
Subsp. – Subespécie
TSA - Teste de sensibilidade a antibióticos
TZP - Piperacilina/tazobactam
UVB - radiação ultravioleta B
UPEC - *E. coli* uropatogénicas
 $\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro
 μM – micrómetro
 μL – microlitro

Índice

Índice de tabelas	10
Índice de figuras	11
Casuística do Estágio	13
Introdução	19
Material e métodos	33
Resultados	41
Discussão	52
Conclusão	58
Bibliografia	59

Índice de tabelas

Tabela 1: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Tabela 2: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de algumas espécies de Enterobacterales.....	36
Tabela 3: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados no método de PCR para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), cefalosporinases (AmpC) e carbapenemases nos isolados de Enterobacterales.....	40
Tabela 4: Bactérias Gram-negativas nas amostras da cavidade oral (n=49) e cloaca (n=43) de Geckos Leopardo.....	42
Tabela 5: Serotipos de <i>Salmonella</i> spp. identificados na cavidade oral (n=11) e cloaca (n=24) de Geckos leopardo.....	43
Tabela 6: Enterobacterales resistentes às C3G nos isolados de Geckos Leopardo.....	48
Tabela 7: Resistência aos antibióticos para os isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>pseudomonas</i> spp. nos Geckos Leopardo na cavidade oral e na cloaca.....	50

Índice de figuras

Figura 1. Representação gráfica da distribuição das consultas de mamíferos por espécie, na clínica All Pets Tires.....	14
Figura 2. Representação gráfica distribuição das consultas de aves por espécie, na clínica All Pets Tires.....	14
Figura 3. Representação gráfica da distribuição das consultas de répteis por espécie, na clínica All Pets Tires.....	15
Figura 4. Representação gráfica da distribuição das cirurgias por espécie, na clínica All Pets Tires.....	15
Figura 5. Representação gráfica da distribuição de animais internados por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.....	17
Figura 6. Representação gráfica da distribuição de cirurgias por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.....	17
Figura 7. Representação gráfica da distribuição de consultas por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.....	18
Figura 8. Representação gráfica da distribuição de ecografias por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.....	18
Figura 9 Fotografias de dois exemplares de Geckos Leopardo de diferentes mutações que participaram no estudo.....	21
Figura 10: Recolha de amostras para este estudo: 1-Cavidade cloacal, 2-Cavidade oral.....	33
Figura 11: Representação gráfica das bactérias Gram-negativas nas amostras da cavidade oral e cloaca de Geckos Leopardo.....	42
Figura 12: Representação gráfica dos serotipos de <i>Salmonella</i> spp. identificados na cavidade oral e cloaca de Geckos Leopardo.....	44
Figura 13: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de <i>Salmonella</i> spp. nos Geckos Leopardo na cavidade oral (n=11) e na cloaca (n=27).....	45

Figura 14: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de *citrobacter freudi* nos Geckos Leopardo na cavidade oral (n=2) e na cloaca (n=7).....46

Figura 15: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de *Klebsiella aerogenes* nos Geckos Leopardo na cavidade oral (n=1) e na cloaca (n=4).....47

Casuística do Estágio

A presente dissertação foi escrita de modo a concluir o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa.

O estágio foi dividido pelo autor por duas instituições diferentes, uma dentro e outra fora do país, perfazendo um total de oito meses, ambos no âmbito da clínica e cirurgia de animais exóticos, vulgo novos animais de companhia. A primeira parte foi realizada em Portugal, na All Pets - Clínica Veterinária de Tires, entre 3 de outubro de 2022 e 3 de março de 2023, sob a orientação do Dr. Rui Patrício. A segunda parte foi realizada em Espanha, no hospital Animales Exóticos 24h, entre 13 de março de 2023 e 9 de junho do mesmo ano, sob a orientação do Dr. Javier Fernandez.

As atividades desenvolvidas em cada um dos locais serão apresentadas individualmente.

All Pets - Clínica Veterinária de Tires

Durante os 5 meses na All Pets - Clínica Veterinária de Tires foram acompanhadas maioritariamente consultas e cirurgias de animais exóticos, mas também de animais de companhia. A clínica possui uma sala de espera/recepção, dois consultórios, uma sala de refeições para o *staff*, uma sala de radiologia, uma sala de cirurgia, uma sala de internamento, uma sala de internamento de doenças infectocontagiosas e uma sala de banhos e tosquias.

Na clínica o autor assistiu e auxiliou em consultas e cirurgias de diversas áreas bem como na realização de exames complementares, tratamento e acompanhamento de animais que se encontravam internados. No total foram assistidas 470 consultas (Figuras 1 a 3) e 47 cirurgias (Figura 4), de diferentes espécies.

Após cada consulta/cirurgia, o caso, dúvidas ou ideias eram discutidas com o Médico Veterinário responsável, como por exemplo possíveis diagnósticos diferenciais, tratamentos ou diferentes exames complementares. No âmbito deste estágio foram também assistidos webinars de diversos temas, e os conhecimentos adquiridos foram sendo postos à prova com questões e situações reais. Foi permitida a administração de fármacos, preparação dos animais para cirurgia, realização de esfregaços, necropsias, participação na cirurgia como circulante ou

ajudante de cirurgião, colheita de diversas amostras com zaragatoa bem como correto maneiio e contenção das espécies observadas.



Figura 1. Representação gráfica da distribuição das consultas de mamíferos por espécie, na All Pets Tires.



Figura 2. Representação gráfica distribuição das consultas de aves por espécie, na All Pets Tires.

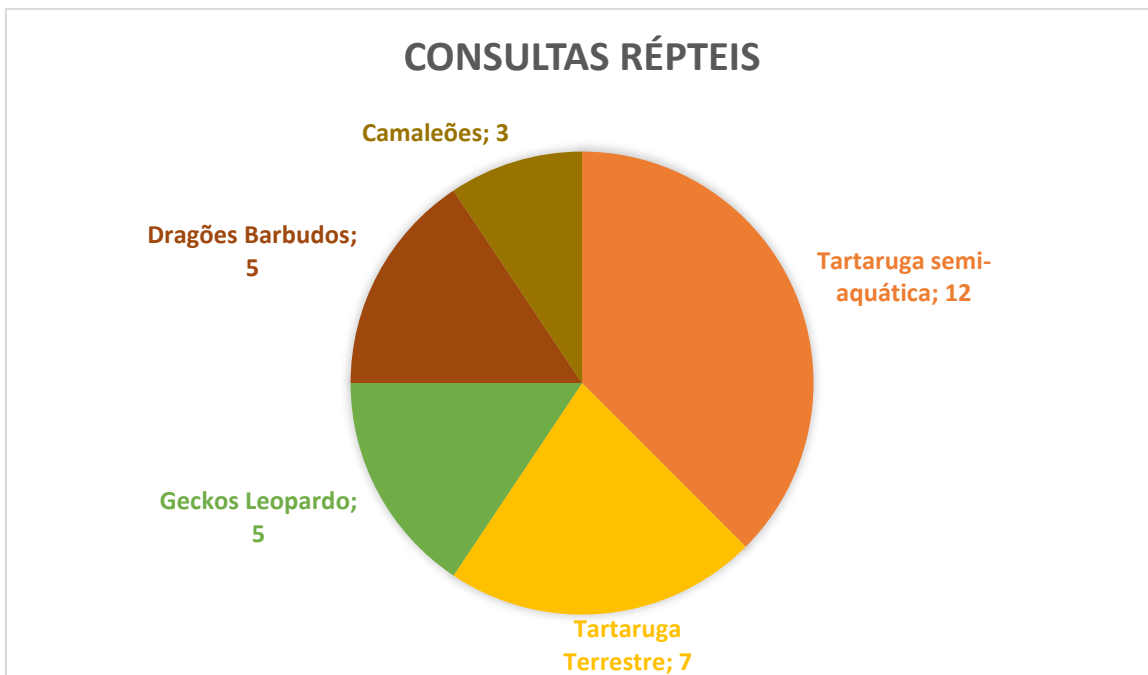


Figura 3. Representação gráfica da distribuição das consultas de répteis por espécie, na All Pets Tires.

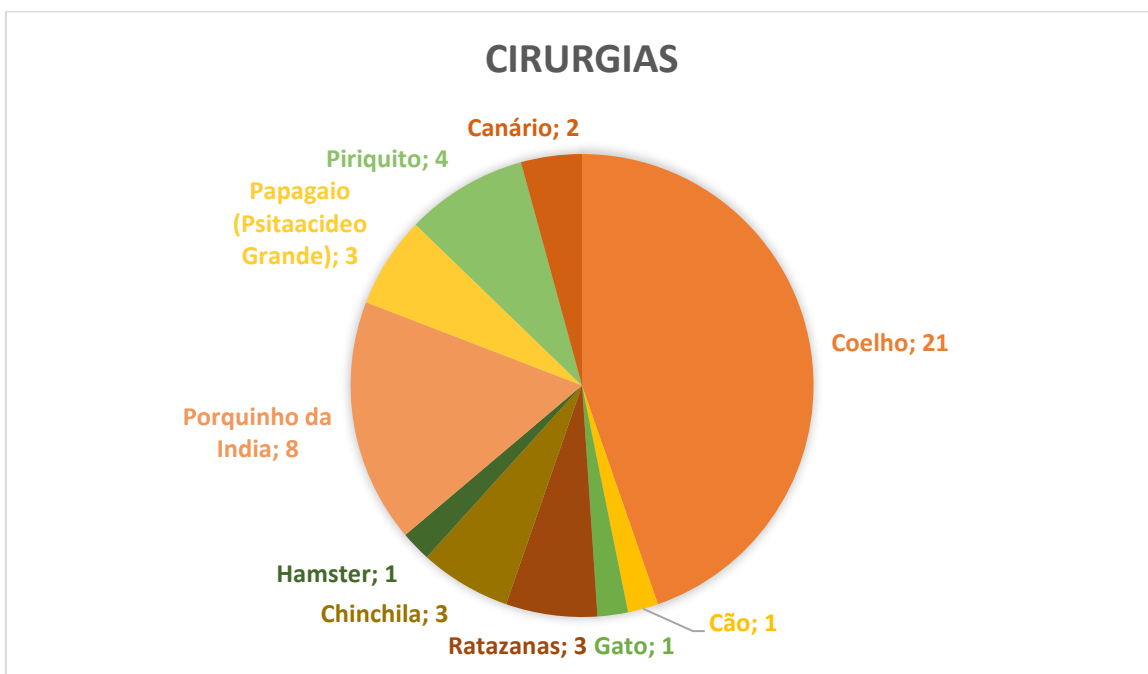


Figura 4. Representação gráfica da distribuição das cirurgias por espécie, na All Pets Tires.

Hospital Animales Exoticos 24h

A segunda parte do estágio teve a duração de 3 meses, no Hospital Animales Exoticos 24h em Madrid Espanha, um hospital dedicado exclusivamente à medicina e cirurgia de animais exóticos. O hospital possui uma sala de espera, três consultórios, um laboratório, uma sala de banhos e tosquiás, duas salas de cirurgia, uma sala de preparação cirúrgica, um internamento de herbívoros, um internamento de carnívoros, um internamento de doenças infetocontagiosas, uma sala de internamento de animais de maior dimensão, uma sala de radiologia, uma sala para o *staff* descansar, uma sala de reuniões e dois espaços para hotel de animais.

À semelhança do primeiro estágio o autor assistiu e auxiliou em consultas e cirurgias de diversas áreas bem como na realização de exames complementares, tratamento e acompanhamento de animais que se encontravam internados (total de 624 animais internados, Figura 5). No total foram assistidas 118 cirurgias (Figura 6) e 857 consultas (Figura 7), de diferentes espécies. Também foi possível acompanhar 138 ecografias de casos do local e referenciados (Figura 8), por uma especialista.

As consultas e cirurgias eram dinâmicas sempre com questões e intervenções da parte do autor e de outros estagiários, foi dada a oportunidade de participar em formações e de colocar em prática autonomamente diversos atos médico-veterinários, diariamente, como colocação de vias, recolha de sangue, vacinação, sedação, entubação, necropsias, colheita de amostras por zaragatoa, esfregaços, coprologias, administração de fármacos e alimentação por sonda.

Também foi possível participar em cirurgias como circulante ou ajudante de cirurgião e acompanhar como veterinário secundário, o veterinário principal a consultas ao domicílio.

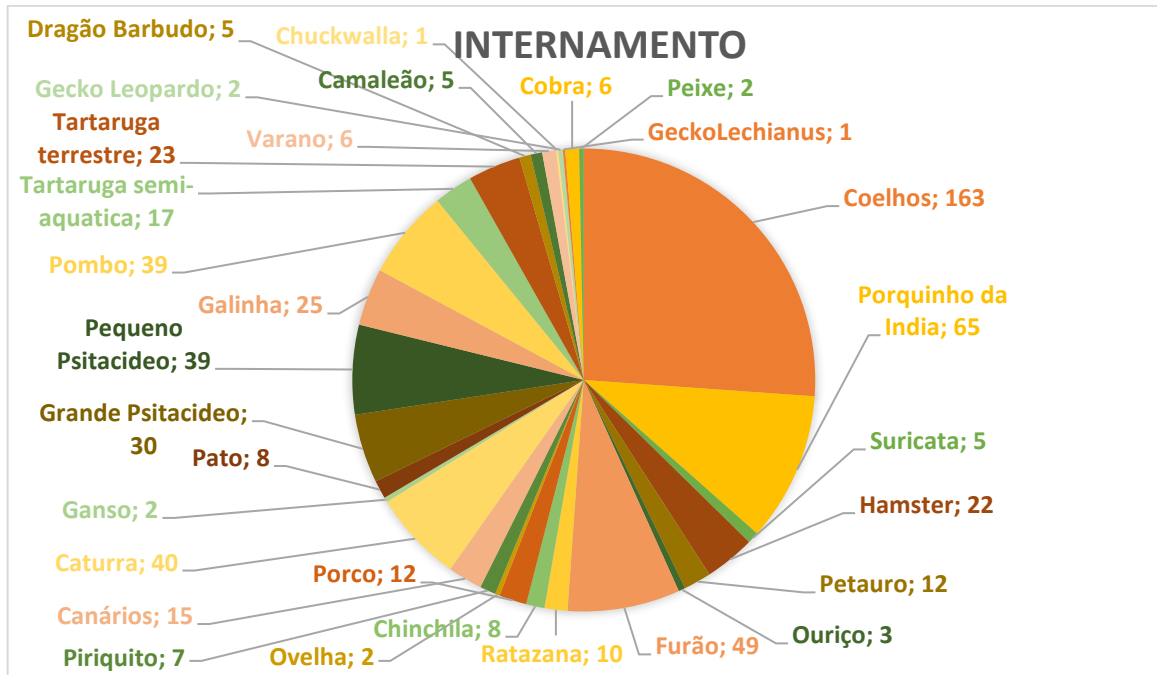


Figura 5. Representação gráfica da distribuição de animais internados por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.

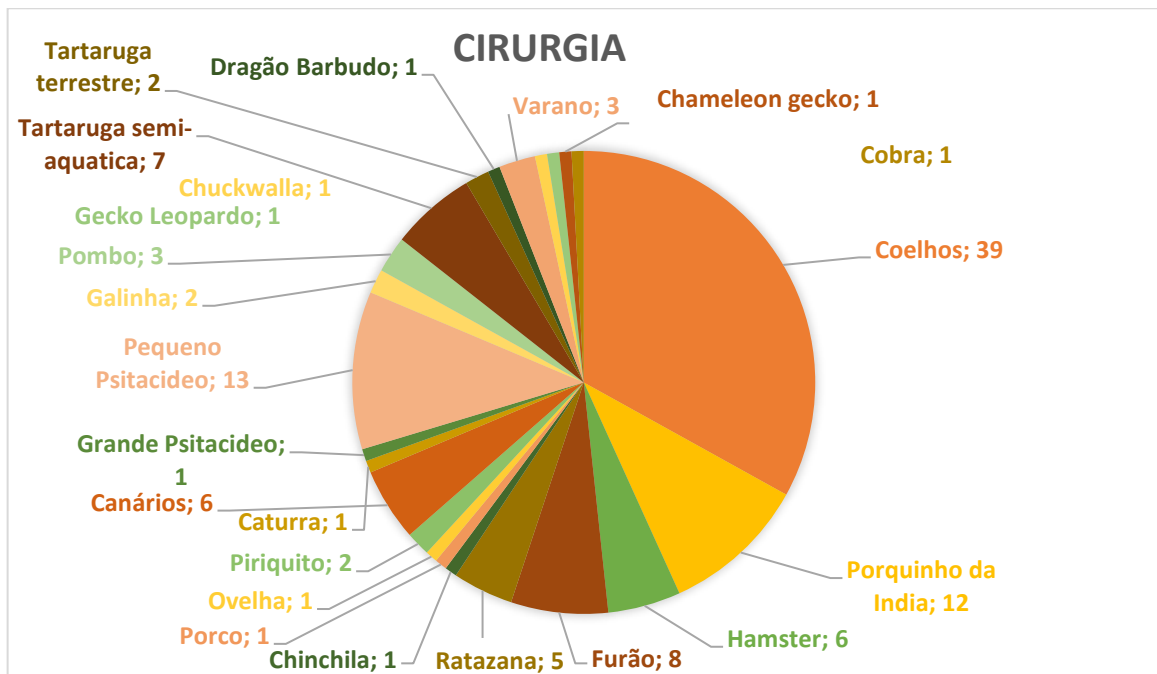


Figura 6. Representação gráfica da distribuição de cirurgias por espécie, no hospital Animales exóticos 24h.

Introdução

Os estudos que envolvem a caracterização de patógenos em répteis até à data são muito escassos, existindo um número muito reduzido de publicações em relação à caracterização dos vários patogénios que estes animais podem conter na sua microbiota. É um risco não só para os animais como também para os humanos que possam contactar com os mesmos (Bjelland *et al.*, 2020). O contacto entre os animais de estimação e humanos pode levar a transmissões interespecíficas, quer de uma direção quer de outra, de bactérias resistentes a antibióticos, no entanto a informação disponível e existente em relação a estes patogénios em Geckos leopardo é muito limitada, por isso é fundamental aumentar o conhecimento e informação, de um ponto de vista “One Health”, relativamente à transmissão e presença dos mesmos, principalmente de bactérias multirresistentes (MDR), de modo a combater as resistências antimicrobianas. Existe cada vez mais um aumento da preocupação, a nível global, com o uso incorreto de antibióticos, assim sendo, reuniões internacionais acerca deste tópico apoiam uma abordagem “One Health” ao problema. Esta abordagem é definida como multissetorial, colaborativa e que atua a nível transdisciplinar, local, regional, nacional e global, de forma a atingir uma só saúde e bem-estar de animais, pessoas, plantas e ambiente partilhado por todos, reconhecendo as suas relações e interações entre si (One Health Commission, 2018).

Nesta abordagem tanto a medicina humana como veterinária são responsáveis por preservar a eficácia dos antibióticos existentes (McEwen & Collignon, 2018). Nos últimos anos foi aumentando a preocupação dos animais de companhia (cão e gato) terem um papel como reservatórios de resistências a antibióticos (Belas *et al.*, 2020; Belas *et al.* 2021), no entanto pouco ou nada foi discutido acerca dos classificados como “novos animais de companhia”. Este aumento das resistências em animais torna-se um desafio para a medicina veterinária, uma vez que limita as opções terapêuticas e, como demonstram diversos estudos, existe a possibilidade de transmissão de algumas estirpes de bactérias de animais de companhia para humanos e vice-versa (Belas *et al.*, 2022). Apareceram também *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina e Enterobacterales produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs), de cefalosporinases (AmpC) e de carbapenemases (CP), existindo cada vez mais casos de animais de companhia com infeções de pele e tecidos moles, bem como colonização de animais saudáveis, pelas mesmas (Belas *et al.*, 2022).

Considerando o ambiente partilhado entre humanos e animais de companhia, as suas interações e o aumento da frequência de aparecimento de bactérias multirresistentes tanto em

humanos como em animais, novas oportunidades são criadas para transferências interespecíficas de genes ou bactérias resistentes, através de contacto direto ou indireto (Belas *et al.*, 2020).

Apesar de tudo, as informações sobre bactérias multirresistentes em animais exóticos são escassas, o que deve ser um facto a ter em consideração, pois a procura por este tipo de animais tem vindo a aumentar muito nos últimos anos (Casey *et al.*, 2015). Por esta razão é urgente obter informação sobre o papel destes animais na transmissão deste tipo de bactérias. Entre os répteis mantidos como animal de estimação, um dos mais populares é o gecko leopardo (Kubiak, 2021), no entanto podem transportar uma grande variedade de patogénios, trazendo riscos não só para o animal, como para a coleção e também para os humanos em contacto com o mesmo (Bjelland *et al.*, 2020).

Repteis como animais de estimação

Com o aumento da procura por animais exóticos como animais de companhia, a popularidade dos répteis tem aumentado muito nos últimos anos (Amaral *et al.*, 2021). Entre os animais exóticos, destaca-se uma espécie em particular, o gecko leopardo (*Eublepharis macularius*), de acordo com Valdez (2021) o gecko leopardo é atualmente o terceiro animal com maior procura em termos de comércio de répteis, e é de longe a espécie de gecko mais popular em cativeiro, quer para tutores iniciantes ou mais experientes (Kubiak, 2021). Isto deve-se à vasta gama de colorações e variedades que apresentam, ao facto de serem animais que requerem pouco cuidado, à sua natureza dócil e facilidade em reproduzir (Kubiak, 2021).

Na prática clínica é a segunda espécie de réptil mais vista, com cerca de 13% dos casos (Boyer, 2013; Kubiak, 2021).

Caracterização da espécie gecko leopardo (*Eublepharis macularius*)

O gecko leopardo pertence à Classe Reptilia, Ordem Squamata, Família *Gekkonidae* do Género *Eublepharis*, sendo o único género da família com pálpebras móveis (Divers & Stahl, 2019). Os animais desta espécie podem atingir entre 20 e 25 cm e pesam de 45 a 110 gramas em adultos, sendo os machos geralmente maiores (Kubiak, 2021). São nativos de zonas desérticas da Ásia, mais concretamente do norte da Índia, Paquistão e Afeganistão, podendo chegar na natureza aos 8 a 10 anos de idade, no entanto, em cativeiro, existem registos de vários

animais com 20 anos (Khan, 2009). São animais noturnos e crepusculares que durante o dia se escondem em buracos ou debaixo de rochas (Boyer, 2013).



Figura 9. Dois exemplares de geckos leopardo de diferentes mutações que participaram no estudo (Fotos do autor).

Alimentação de geckos leopardo

Quanto à alimentação, os geckos leopardo são insetívoros e com o avançar da idade tornam-se predadores oportunistas, alimentando-se na natureza de escaravelhos, gafanhotos, aranhas, escorpiões, centopeias e até de geckos mais pequenos ou ratos recém-nascidos (Khan, 2009; Böhme *et al.*, 2011).

Em cativeiro, as crias recém-nascidos, com 4/5 dias de idade (após a primeira muda de pele) começam a alimentar-se de pequenos grilos (Boyer, 2013). Em adultos alimentam-se de uma maior variedade de insetos, como por exemplo gafanhotos, grilos, baratas, tenébrios, larvas do mel e bichos-da-seda (Kubiak, 2021). Estes insetos devem ser alimentados com fruta e vegetais frescos polvilhados previamente com suplemento de cálcio antes de serem oferecidos aos animais, de modo a aumentar o seu valor nutricional (Boyer, 2013). Em alternativa a polvilhar a fruta e os vegetais frescos com cálcio, pode-se colocar um recipiente com cálcio no terrário (Kubiak, 2021).

Conservação da espécie gecko leopardo

De acordo com a lista "*IUCN Red List of Threatened Species*" o estado de conservação do gecko leopardo no seu habitat natural é pouco preocupante (Papenfuss *et al.*, 2021) apesar de ser predado por diversos animais selvagens, como raposas, chacais, mangustos, corujas, milhafres, varanídeos, outros lagartos e cobras (Papenfuss *et al.*, 2021), a maior ameaça desta espécie é o homem, uma vez que existe uma crença popular em algumas zonas do mundo, como

no Paquistão, Afeganistão, Nepal e Índia, de que se trata de um réptil venenoso, acabando por ser morto pelos locais (Khan, 2009).

Reprodução da espécie gecko leopardo

A época de reprodução desta espécie vai de janeiro a setembro. As fêmeas colocam um par de ovos a cada 3 a 4 semanas, perfazendo um total de 4 até 10 posturas por época, sendo a maioria das vezes 6, podendo as fêmeas guardar o sêmen dos machos durante 1 ano (Boyer, 2013). O período de gestação são 21 a 28 dias e o tempo de incubação dos ovos varia entre os 45 e os 60 dias, dependendo da temperatura (Kubiak, 2021).

O sexo é determinado pela temperatura de incubação, nascendo fêmeas entre os 25° e 26°C, os machos entre os 32° e 33° C e ambos os sexos entre 27° e 31° C (Divers & Stahl, 2019).

Os machos maduros são maiores que as fêmeas e têm o desenvolvimento visível de poros pre-femorais craniais à abertura cloacal, também apresentam 2 inchaços caudais a esta abertura correspondentes aos hemipenis (Stevens *et al.*, 2008). As fêmeas e os juvenis não apresentam estes poros tão desenvolvidos e a base da cauda caudal à abertura cloacal é lisa (Kubiak, 2021).

Geckos leopardo em cativeiro

O habitat do geckos leopardo é classificado como terrestre e desértico. Estes animais devem ser mantidos em terrários horizontais de vidro, plástico ou madeira com no mínimo 60cm×60cm×30cm para um animal e 90cm×60cm×30cm para um par de animais. Estes terrários devem conter aberturas que permitam a circulação de ar e uma correta ventilação. O terrário deve ter ainda duas zonas: uma zona húmida (que durante a noite atinja os 20°C) e uma zona seca (que durante o dia atinja os 32°C) (Kubiak, 2021). As temperaturas indicadas podem ser atingidas pela colocação de lâmpadas de aquecimento, tapetes de aquecimento colocados por baixo do terrário e/ou cabos de aquecimento colocados no interior do terrário e ligados a um termostato (Boyer, 2013). Para além disto, o terrário deve ser decorado (não em demasia) de forma a estimular o animal. Devem ser colocados pelo menos dois esconderijos, um na zona seca e um na zona húmida. Os esconderijos húmidos são importantes na altura da muda da pele, ajudando o animal a evitar problemas com a mesma (Kubiak, 2021). Para além do referido, uma taça com água deve estar sempre *ad libitum* nesta zona do terrário, apesar deles raramente a utilizarem pois absorvem a maior parte da água que necessitam da alimentação, a água deve ser mudada diariamente de forma prevenir o crescimento de algas e bactérias (Boyer, 2013).

Para este tipo de réptil a areia desértica e rochas são o substrato mais idêntico com o do seu ambiente natural, no entanto apesar da areia ser biologicamente inerte e de permitir facilmente a remoção de fezes, aumenta o risco de empactações intestinais se for ingerida juntamente com a comida (Kubiak, 2021). Para reduzir este risco podem-se fornecer os alimentos fora do terrário ou em taças específicas para o efeito, ou optar-se por outros substratos como o papel de cozinha ou a fibra de coco (Boyer, 2013).

A lâmpada de radiação ultravioleta B (lâmpada de UVB) é algo que deve estar incluída no terrário também, uma vez, os níveis de vitamina D circulantes no sangue são significativamente maiores com a exposição á radiação UVB (Gould *et al.*, 2018).

Higiene e prevenção do ambiente do gecko leopardo

Para os répteis num contexto de cativeiro e em prática clínica a desinfeção e limpeza regular do terrário são essenciais para a obtenção de um ambiente saudável, ajudando a reduzir cargas de patogénios e transmissão de doenças e infeções pós-operatórias (Divers & Stahl, 2019).

A manutenção da higiene difere das necessidades em causa, por exemplo um terrário de um tutor particular difere da necessidade de um criador ou de uma loja de animais. Para cada caso específico o médico veterinário deve aconselhar o tutor com instruções específicas de acordo com as suas necessidades (Divers & Stahl, 2019).

As definições de limpeza, desinfeção e esterilização não são as mesmas, ainda que muitas vezes confundidas. A limpeza refere-se ao ato físico de remover matéria orgânica e detritos sólidos (sujidade, fezes, fluidos corporais, entre outros) e deve sempre preceder a desinfeção e esterilização para eliminar microrganismos infecciosos.

A desinfeção apesar de reduzir a carga de microrganismos, não os elimina completamente. Uma superfície desinfetada pode ainda conter um baixo nível de microrganismos patogénicos quer para o animal, quer para o Homem. No entanto há poucos desinfetantes que funcionam efetivamente na presença de detritos orgânicos (sangue, fezes e urina), assim, é importante uma limpeza completa com um detergente neutro, seguida de um enxaguamento completo com água quente antes da desinfeção. A limpeza deve ser realizada num local apropriado, longe das zonas de preparação de alimentos e devem ser usadas luvas descartáveis. Os desinfetantes devem ser misturados seguindo as instruções do fabricante, pois uma concentração muito diluída é ineficaz e uma muito forte pode ser tóxica para o animal

(Divers & Stahl, 2019). Para além disto, alguns terrários com materiais de plástico e borracha podem reter produtos químicos, no caso de os desinfetantes não serem bem enxaguados e lavados, podem ser libertados de volta no ambiente, água ou substrato do terrário, causando efeitos potencialmente tóxicos para o animal. (Stoskopf *et al.*, 2001).

O amoníaco e a lixívia são desinfetantes excelentes e baratos. O amoníaco pode ser usado sem diluição e a lixívia deve ser diluída numa concentração de trabalho de 1% a 5%. Ambas as soluções são adequadas para matar os microrganismos mais comuns, sendo o tempo de contato fundamental para a eficácia. Os objetos do terrário devem ficar de molho por um período de 5 a 30 minutos, dependendo microrganismo em questão e do desinfetante usado. (Divers & Stahl, 2019).

Os substratos e os materiais porosos que não podem ser limpos de forma eficaz (papel, aparas de madeiras, terra, fibra de coco e madeira), devem ser descartados e substituídos quando estiverem sujos (Divers & Stahl, 2019).

Para além do exposto, uma boa higiene das mãos é extremamente importante para evitar a disseminação de microrganismos entre os próprios animais e entre animais e humanos (Nakamura *et al.*, 2012; Loveday *et al.*, 2014). Desinfetantes para as mãos à base de álcool continuam a ser a escolha inicial para a higiene das mãos na medicina humana, a menos que as mãos estejam visivelmente contaminadas com material orgânico, onde sabão líquido e água são mais recomendados (Loveday *et al.*, 2014). Por sua vez, a esterilização, elimina os microrganismos, podendo ser usada a exposição ao vapor em altas pressões e certos produtos químicos (como gás óxido de etileno, peróxido ou formalina) (Divers & Stahl, 2019).

Caracterização da flora bacteriana residente com impacto zoonótico

Enterobacterales

Enterobacterales é uma ordem de bactérias Gram-negativas composta por sete famílias, tendo três delas mais relevância do ponto de vista clínico. Estas três são *Enterobacteriaceae*, que incluem bactérias dos géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, entre outros; *Yersiniaceae*, que incluem *Yersinia* e *Serratia*; e por último *Morganellaceae*, como por exemplo *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*. Embora as Enterobacterales estejam geralmente relacionadas como bactérias patogénicas, muitas delas também fazem parte da flora comensal (Adeolu *et al.*, 2016).

***Salmonella* spp**

As bactérias do género *Salmonella* spp. são anaeróbias facultativas, Gram-negativas, em forma de bastonete, sendo os répteis conhecidos como portadores assintomáticos nas suas mucosas gastrointestinais (Bjelland et al., 2020).

A salmonelose em répteis causa infeções gastrointestinais, onde os animais se tornam portadores durante toda a vida, excretando intermitentemente a bactéria. Uma grande variedade de sinais clínicos e um grande desenvolvimento de patologias podem ser observados, incluindo anorexia, letargia, paresia, caquexia, dispneia, celomite, abscessos/granulomas, dermatite, choque hipovolémico e morte. Na necropsia as lesões podem incluir dermatite necrótica, focos inflamatórios e necróticos em órgãos parenquimatosos, edema na submucosa intestinal, infiltração celular inflamatória do pulmão, enterite ulcerativa com formação de pseudomembrana, osteomielite espinhal com lesões necróticas, ooforite crónica, degeneração folicular, hemorragias e exsudatos pericárdicos. *Salmonella* entérica da subespécie *arizonae* apresenta alto tropismo para tecido ósseo, causando osteomielite espinhal subaguda, crónica e progressiva. Devido a malformações espinhais, os répteis afetados apresentam locomoção anormal. Para confirmar o diagnóstico deve ser realizado uma cultura com agar seletivo e meio de enriquecimento, no entanto a reação de cadeia de polimerase (PCR) tem maior sensibilidade e especificidade do que as culturas, devendo também ser realizada a eletroforese em gel de campo pulsado nos isolados para confirmação. É muito importante que o hospedeiro demonstre uma resposta patológica antes de iniciar quaisquer tratamentos, para diferenciar entre situações de bactérias comensais e causadoras de doença. Não é recomendado testar um réptil clinicamente saudável para tentar declará-lo “livre de salmonela” pois existe uma alta probabilidade de falsos negativos devido à excreção intermitente (Divers & Stahl, 2019).

No entanto sinais de doença só se manifestam quando o animal se encontra imunodeprimido, desnutrido, quando estão presentes erros no manejo e criação, casos de stress ou doenças concomitantes, apesar da taxa de excreção infeção ser comum entre animais que coabitam (Divers & Stahl, 2019).

Em humanos existem muitos relatos de casos de infeções por salmonela associadas a répteis por todo o mundo. Na Noruega, a ocorrência de salmonelose em humanos é baixa em comparação com outros países, com cerca de 1000 casos relatados anualmente, no entanto, em agosto de 2017, foi legalizada a posse de animais de estimação de 19 espécies diferentes de

répteis, incluindo cobras, lagartos e quelônios, sendo que antes disso a permissão para manter répteis era dada quase exclusivamente a zoológicos e aquários, sendo proibidos estes animais se fossem de propriedade privada. Até à data apenas um único caso de salmonelose associada a répteis foi relatado na Noruega, no entanto esta nova legislação tem levado a um aumento de preocupações no que toca ao aumento da ocorrência de salmonelose. O risco de SAR em humanos depende de vários fatores, como a prevalência, a predominância da estirpe, a patogenicidade, a exposição e a imunocompetência do ser humano. (Bjelland *et al.*, 2020) podendo causar sintomas gastrointestinais, incluindo diarreias agudas, vômitos, febre, dor abdominal e desidratação. Outro estudo que avaliou a presença de *Salmonella* spp em 110 geckos tokay, identificou uma prevalência de 31% a 73% dentro de 3 grupos com 17 estirpes diferentes (Smith *et al.* 2012).

As infeções por *Salmonella* spp. são um sério problema mundial, tanto a nível epidemiológico como a nível económico, num contexto de segurança alimentar e saúde pública. As infeções por esta bactéria estão entre as patologias alimentares mais comuns em humanos na união europeia, com um total de 88715 casos reportados em 2014, dos quais 34.4% resultaram em hospitalizações (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Em humanos infetados com *Salmonella* spp., o antibiótico de eleição é uma cefalosporina de terceira geração (por exemplo ceftriaxona), caso não tenha efeito ou existam estirpes resistentes, são utilizados carbapenem (por exemplo meropen) e flouroquinolonas (por exemplo ciprofloxacina) em casos de tratamentos mais prolongados (4 semanas ou mais) (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

No caso dos reptéis com infeções com sintomatologia por esta bactéria, o procedimento padrão é a utilização de aminoglicosídeos (como a amicacina ou a gentamicina), seguidamente de cefalosporinas de terceira geração (por exemplo a ceftazidima e o ceftiofur) (Divers & Stahl, 2019)

Dado o potencial zoonótico e o aumento de deteção de estirpes associadas aos reptéis, seria aconselhado como precaução a realização de uma triagem a todos os reptéis “pet”, no entanto sendo a eliminação intermitente e rara, complica a deteção e o tratamento com antibióticos sem sintomatologia não é aconselhado. É mais pratico informar os tutores que os seus répteis podem ser portadores de salmonela podendo eliminar a mesma intermitentemente nas fezes, e que por isso devem ser conscientes e ter os devidos cuidados de higiene do que fazer testagens de rotina (Kubiak, 2021).

Num estudo de 2012, realizado por Smith e colaboradores, seis isolados de *salmonella* (6,8%) apresentaram resistência a mais do que um antibiótico. Todos os isolados de *Salmonella enterica* ser. Adelaide eram resistentes a ácido nalidíxico e sulfisoxazol, um isolado de *Salmonella* entérica subsp. *Arizonae* era resistente a ampicilina e sulfisoxazol, e outro da mesma subsp. era resistente a estreptomicina e também sulfametaxazol (Smith *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência da *Salmonella* spp. a antibióticos podem ser classificados como modificações da ação ou destruição do agente antimicrobiano, ou como remoções ativas do antibiótico da célula (efluxo). A resistência adquirida nesta bactéria também pode resultar de uma mutação estrutural ou regulatória em genes nos cromossomas e/ou aquisição de novas sequências genéticas transportadas para os elementos móveis (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

A presença de apenas um destes mecanismos de resistência não garante, no entanto, a sobrevivência da bactéria, sendo por isso bastante comum a ocorrência de mais do que um mecanismo de resistência. No caso da *Salmonella* spp. é mais comumente observado a resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas, tetraciclina, sulfonamidas, trimetopim e também à colistina (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Escherichia coli

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa muito comum da microbiota intestinal natural tanto de humanos como de animais. Dentro das diferentes estirpes, além das comensais, também existem estirpes patogênicas intestinais de *E. coli* (IPEC) e estirpes patogênicas extraintestinais de *E. coli* (ExPEC) (Toombs-Ruane *et al.*, 2020).

As bactérias IPEC estão associadas a infecções do trato gastrointestinal e podem ser diferenciadas de acordo com a sua patogenicidade: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* invasiva aderente (AIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

As ExPEC causam infecções extraintestinais, e neste grupo podemos incluir: *E. coli* uropatogénicas (UPEC) associadas a infecções do trato urinário em humanos e animais, *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC), *E. coli* septicémica (SePEC) que causa infecções sistémicas em humanos e animais, *E. coli* patogénica para aves (APEC) que causa a colibacilose

aviária, e uma linhagem ExPEC potencialmente emergente denominada de *E. coli* endometrial patogénica (EnPEC) (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

As infeções por *E. coli* em animais são tratadas com recurso a diversos antibióticos, por exemplo cefalosporinas e fluoroquinolonas (Silva *et al.*, 2022).

Enterobacterales produtoras de β -lactamases de espectro alargado, de cefalosporinases (ESBLs/AmpC) e carbapenemases

Um dos mecanismos de resistência a antibióticos de elevado interesse na ordem das Enterobacterales é a produção de enzimas que têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, chamadas de ESBLs. Inicialmente, as bactérias com ESBLs eram conhecidas apenas como agentes etiológicos em infeções hospitalares, contudo sabe-se agora que são também a causa de infeções adquiridas nas populações e casos de transmissão destas bactérias também ocorrem (Urban-Chmiel *et al.*, 2022). O mecanismo envolve a produção de uma enzima do grupo metalo- β -lactamase que confere esta resistência aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos, sendo estes considerados antibióticos de último recurso, devido ao seu largo espectro de ação contra bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

As cefalosporinases (AmpC) são enzimas clinicamente importantes, codificadas nos cromossomas de muitas Enterobacterales. Estas enzimas decompõem todas as penicilinas e a maioria das cefalosporinas (principalmente as de primeira e de segunda geração), exceto cefepima, mas não hidrolisam o aztreonam. Estas enzimas não hidrolisam carbapenemos e não são inibidas pelo ácido clavulânico. A expressão deste tipo de β -lactamase é geralmente induzível, mas no caso da *E. coli* ocorre a um nível muito baixo e não confere resistência a β -lactâmicos às estirpes selvagens (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Segundo um estudo de 2020, realizado por Toombs-Ruane *et al.* em que foi avaliada presença de *E. coli* produtora de ESBLs/AmpC entre humanos e animais no agregado familiar, foi concluído que a mesma estirpe de *E. coli* produtora de ESBL/AmpC foi transmitida entre membros da família e os animais de companhia, sugerindo que a transmissão ocorreu através do contato entre pessoas e animais de estimação (Toombs-Ruane *et al.*, 2020).

Carbapenemases são β -lactamases com capacidades hidrolíticas muito versáteis, têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos. As

bactérias que produzem estas β -lactamases são um problema de saúde pública, uma vez que podem causar infecções graves nas quais a atividade das carbapenemases torna muitos dos antibióticos da classe dos β -lactâmicos ineficazes (Queenan & Bush, 2007; Rincón-Real & Suárez-Alfonso, 2022).

Pseudomonadales

Pseudomonadales é uma ordem de bactérias Gram –negativas, da qual alguns membros são importantes agentes em infecções oportunistas com grande importância em saúde humana e veterinária. Esta ordem conta com quatro famílias, sendo as espécies patogênicas dos gêneros *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* e *Acinetobacteraceae*. (Whitby, 2022).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, conhecida por ter múltiplas resistências antimicrobianas e por ser bastante comum no meio ambiente. É um microrganismo oportunista que infecta principalmente pacientes com fibrose cística, queimaduras e organismos imunocomprometidos. em humanos as infecções podem envolver qualquer parte do corpo e causar diversos sintomas, desde infecções gastrointestinais menores, diarreias, febre, dor de cabeça a meningite, ceratite bacteriana, endoftalmite e enterocolite necrosante (Wendt *et al.*, 2017).

A virulência de *P. aeruginosa* está associada a combinação de diversos fatores, entre eles, os estímulos ambientais, a transmissão horizontal dos genes e variações dentro das ilhas de patogenicidade, mas também se deve a determinadas características conservadas no seu genoma. Estas características incluem a capacidade de secretar exotoxinas, elastase e proteínas do tipo III sendo os genes que codificam esses fatores o *toxA*, *lasB* e *exoS*, respectivamente (Wendt *et al.*, 2017).

Esta bactéria para além de ser tão comum no meio ambiente, tanto em água como em terra, e em objetos do dia a dia, também é comumente encontrada na cavidade oral e trato intestinal dos répteis, e como patógeno oportunista pode causar estomatite ulcerativa, pneumonia, dermatite e septicemia. Ou seja, *P. aeruginosa* para além de representar perigo para os répteis imunocomprometidos, também constitui uma fonte potencial de doenças zoonóticas e além disso, a matéria fecal de um réptil contendo *P. aeruginosa* pode contaminar o terrário onde ele se encontra, e a adaptabilidade desta bactéria permite que prospere em diversos

ambientes, especialmente aqueles que não são limpos minuciosamente e regularmente (de Sousa et al., 2021).

Em 2017, na Coreia foi realizado um estudo em 24 tartarugas de 7 espécies domésticas diferentes, com o objetivo de identificar e caracterizar a suscetibilidade a antibióticos e a presença de fatores de virulência de *P. aeruginosa*. Cerca de 70% (n=17/24) das amostras foram positivas para *P. aeruginosa* e 100% dos isolados foram positivos para os genes *toxA* e *lasB* e 53% ao gene *exoS*. No teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) todas as amostras foram resistentes à amoxicilina, colistina, estreptomicina, cefalotina, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, imipenem, ceftiofina e ácido nalidíxico; 82% foram resistentes à gentamicina, 59% à ceftriaxona, 65% à tetraciclina e 59% à ampicilina. No entanto, todos os isolados testados eram suscetíveis às fluoroquinolonas testadas, ciprofloxacina e ofloxacina (Wendt et al., 2017).

Agentes bacterianos ESKAPE

ESKAPE é uma sigla utilizada para caracterizar um grupo composto por seis agentes bacterianos nosocomiais que apresentam múltiplas resistências a antibióticos e elevada virulência. Sendo estes *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. O uso indiscriminado de antibióticos tem provocado o aparecimento de bactérias multirresistentes. Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos, com o objetivo de desenvolver novas terapêuticas para tratar agentes bacterianos resistentes a antibióticos, especialmente os agentes bacterianos ESKAPE, sendo terapias alternativas com o uso de antibióticos em combinação ou com adjuvantes como bacteriófagos, antimicrobianos peptídeos, nanopartículas e terapia de luz fotodinâmica (Mulani et al., 2019).

Problemática da resistência aos antibióticos em répteis

As recomendações para dosagem, administração e via de administração de antibióticos em répteis são limitadas, e foram baseadas em sugestões empíricas derivadas de evidências obtidas por meio de pesquisas com mamíferos domésticos ou “resultados positivos” derivados de relatos de casos. Estas limitações podem ser atribuídas à falta de estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos avaliando especificamente antibióticos em répteis, apesar de nos últimos anos terem sido realizados alguns avanços na área (Divers & Stahl, 2019).

Existem alguns fatores que devem ser considerados ao selecionar um antibiótico para tratar uma infecção bacteriana: o espectro do antibiótico (exemplo, Gram-positivo vs Gram-

negativo, aeróbico vs anaeróbico); a resistência ao antibiótico adquirida; o mecanismo de ação; a distribuição no tecido; o efeito; as vias metabólicas e excretoras; a dose e volume necessários de antibiótico; a via e a frequência de administração do antibiótico. O antibiótico com o espectro de atividade mais estreito deve ser selecionado para tratar o agente bacteriano para limitar os danos colaterais à microbiota do animal. Um antibiótico só deve ser administrado após a confirmação da existência de uma infecção, idealmente, após cultura bacteriana e a realização do TSA para se selecionar o antibiótico preferencial para o caso em questão. Enquanto se aguarda pela confirmação, o veterinário deve selecionar um antibiótico com base nas colorações de Gram, citologia e experiência anterior. Embora limitado em sensibilidade, o exame citológico de uma lesão pode ser usado para determinar se a microflora associada a esta é homogênea ou heterogênea, essa informação pode ser usada para orientar na seleção do antibiótico. A maioria das bactérias isoladas nos répteis são Gram-negativas, embora também ocorram infecções por bactérias Gram-positivas (Divers & Stahl, 2019).

Alternativas ao uso de antibióticos em medicina veterinária

A maior preocupação com o método atual de tratamento de infecções é a pressão seletiva que os antibióticos exercem sobre as bactérias, o que leva ao aparecimento de resistência a antibióticos. Até que sejam encontradas técnicas para administrar um tratamento que não afete a microbiota comensal, o risco de originar bactérias resistentes a antibióticos vai sempre existir, e são necessários esforços contínuos para diminuir esse risco. De um modo geral é necessário reduzir a dependência do uso de antibióticos na medicina veterinária, incluindo na área de clínica de exóticos. (Divers & Stahl, 2019).

Na medicina de répteis é bastante comum que os veterinários tratem animais empiricamente com antibióticos que usaram em outros casos idênticos que já tenham tido. Contudo, a prescrição de antibióticos deve ser apenas realizada nas seguintes situações: casos de trauma ou feridas graves; no tratamento de uma infecção bacteriana confirmada; para prevenir a infecção nos casos de um animal estar imunocomprometido (Divers & Stahl, 2019). Todos os médicos veterinários devem avaliar criticamente as suas práticas de prescrição e criar políticas apropriadas de administração de antibióticos na sua atividade. (Divers & Stahl, 2019). A realização de cultura bacteriana e o TSA pode auxiliar a decisão de se administrar ou não um antibiótico. No caso de uma ação rápida onde não se possa esperar pelo TSA, são recomendados

aminoglicosídeos (como a gentamicina ou a amicacina) e em casos mais graves, cefalosporinas de terceira geração (como a ceftazidima) (Divers & Stahl, 2019).

Atualmente, existem alternativas aos antibióticos, como por exemplo o uso de biocidas (clorexidina, iodopovidona, mel medicinal) para tratamento tópico e a terapia com bacteriófagos (terapia fágica) que foi estabelecida nestes casos, porque apenas as bactérias alvo sofrem lise, sendo assim agentes de biocontrole (Divers & Stahl, 2019). Segundo Kwon e colaboradores (2021), em testes *in vitro* de degradação de um biofilme em pele de réptil e placas de poliestireno, os tratamentos com bacteriófagos de baixa e alta concentração reduziram a viabilidade das células bacterianas em aproximadamente 2,5-3 log de unidades formadoras de colônias e diminuíram também a biomassa (Kwon *et al.*, 2021).

Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a flora bacteriana Gram-negativa da cavidade oral e da cloaca de geckos leopardo (*Eublepharis macularius*). Para tal realizou-se a identificação de bactérias Gram-negativas isoladas de geckos leopardo saudáveis, caracterizou-se a suscetibilidade aos antibióticos e caracterizaram-se os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente a produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), cefalosporinases e carbapenemases.

Material e métodos

Caraterização da amostra

As amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram obtidas no âmbito do Projeto estratégico PATHOGeckos, financiado pela Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona -Centro Universitário de Lisboa – COFAC. Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona -Centro Universitário de Lisboa (Parecer nº20/2022).

Os geckos selecionados para integrar este estudo eram animais aparentemente saudáveis, apresentavam uma cauda gorda e sem deformações visíveis, como por exemplo ossos a sair da pele. Habitavam em terrários horizontais, em vidro ou plástico, com substrato de fibra de coco ecológica, cuja fonte de aquecimento eram em tapetes de aquecimento externos, todos sem lâmpada UV e com água sempre à disposição. A base da alimentação de todos os animais consistia em insetos vivos (tenebrios, baratas dúbias, *zoophobas*, larvas do mel, grilos e gafanhotos) obtidos comercialmente.

Para a realização deste estudo foram recolhidas amostras de 56 animais através de zaragatoas, 2 para cada animal, uma da cavidade oral e outra da cloaca. Mas no total foram contabilizadas 92 amostras sendo 49 orais e 43 cloacais. Os animais incluídos no estudo foram provenientes de tutores/criadores da zona de Lisboa com o consentimento dos mesmos.

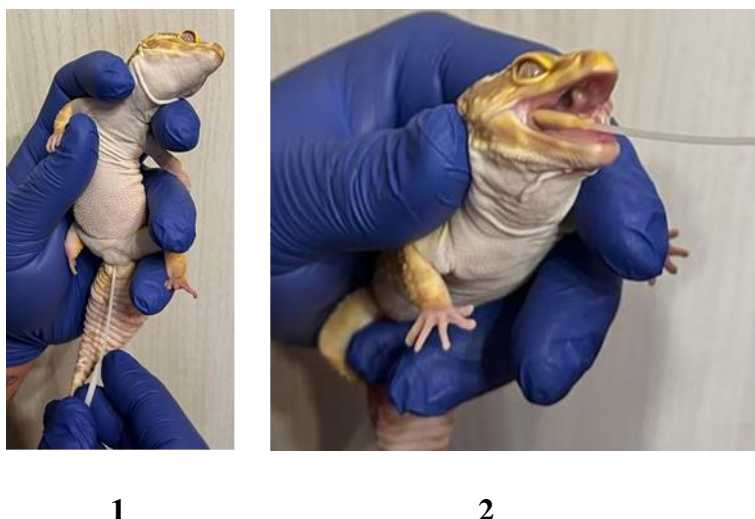


Figura 10: Recolha de amostras para este estudo: **1**-Cavidade cloacal, **2**-Cavidade oral (Fotos do autor).

Isolamento e identificação de bactérias Gram-negativas (Pseudomonadales e Enterobacterales)

Após a receção das zaragatoas da cloaca e orais no laboratório, o isolamento e identificação das ordens Pseudomonadales e Enterobacterales foi realizado de acordo com os métodos bacteriológicos existentes no Laboratório. Resumidamente, as sementeiras foram realizadas em meio Columbia + 5% sangue de carneiro (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), em meio MacConkey agar (Biokar Diagnostics, França), meio IRIS Salmonella® (Biokar) e UriSelect™4 Medium (Biorad Laboratories, USA). Para deteção de Enterobacterales resistentes C3G e aos CP foi realizada sementeira em meio MacConkey agar suplementado com 1,0 µg/mL cefotaxima (ThermoFisher Scientific, Inglaterra) e 1,5 µg/mL meropeneme (Tcichemicals, Germany), respetivamente. Após 24-48h de incubação verificou-se o crescimento das colónias bacterianas não fermentadoras e fermentadoras. As diferentes colónias obtidas foram isoladas em Columbia + 5% sangue de carneiro (Oxoid) e realizado o teste da Oxidase (PanReac AppliChem, Alemanha).

Extração de DNA de bactérias Gram-negativas

Existindo vários métodos para realizar este procedimento, a extração de DNA pode ser dividida em dois procedimentos principais, a lise das células presentes na amostra, através da ruptura das membranas citoplasmáticas, e a separação e purificação do DNA dos outros componentes lisados (Shetty, 2020).

A extração de DNA total foi realizado pelo método de fervura (DTU food Nacional Institute, 2023). Para tal realizou-se uma suspensão da cultura da bactéria em estudo em 100 µL de água MiliQe, centrifugou-se durante 15 minutos a 13000 rpm, seguindo-se da fervura em água a 100°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica laboratorial que tem como objetivo amplificar rapidamente milhões a bilhões de cópias de um segmento específico de DNA (Poirel *et al.*, 2011). Por sua vez, a eletroforese em gel de agarose é uma técnica laboratorial relativamente fácil de usar, aplicada grande maioria das vezes para avaliar o sucesso da reação de PCR. Consiste na separação molecular por tamanho, os fragmentos são colocados num gel de agarose com pequenos poros e é criado um campo elétrico passando corrente através

do gel, as moléculas vão se mover mais depressa ou mais devagar consoante o seu tamanho e carga elétrica, as com menor peso vão se deslocar mais depressa do que as com maior peso. Para visualização dos fragmentos amplificados são usados agentes intercalantes, tornando assim possível a sua identificação através da comparação das bandas com os controlos positivos (Wittmeier & Hummel, 2022).

Confirmação da espécies bacterianas Gram-negativas por PCR

Pseudomonas spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Para identificação e confirmação do género *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* foi utilizado um multiplex PCR adaptado de Spilker e colaboradores (2004) e de Padmavathy e colaboradores (2012). O método foi realizado com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, 12,5 µL de Supreme NZY Taq II 2x Green Master Mix (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de cada um dos oligonucleótidos (Tabela 1) e 1,5 µL de DNA. A reação realizada em termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena Alemanha) incluiu uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, à qual se seguiram 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 55°C) e extensão (60 segundos a 72°C), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Foi usado um controlo positivo (DNA de estirpe bacteriana previamente sequenciada) e um controlo negativo (onde não existia DNA)

Tabela 1: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*

Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referência
PA_ETA_F PA_ETA_R	GCCTTCGAACATCAAGGTGT CCATGACCACGCTGACC3	207	Padmavathy et al. (2012)
PA-GS-F PA-GS-R	GACGGGTGAGTAATGCCTA CACTGGTGTTCCTTCCTATA	618	Spilker et al. (2004)

De seguida foi realizada a análise de 5 µL de cada reação de PCR através de uma corrida em gel de agarose (Nzytech, Lisboa, Portugal) 1,5% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) durante 60 minutos a 90V, em tina de eletroforese (VWR). Foram adicionados no início da corrida 5 µL de marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V 50-1000pb (NZYtech, Portugal). Os produtos de PCR foram visualizados, após a união com um agente intercalante, utilizando um transluminador ultravioleta (UView™ Mini Tansilluminator, BioRad, França).

Confirmação da ordem Enterobacterales

Confirmação do género *Salmonella* spp., e das espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis*

Para confirmação do género *Salmonella* spp, e das espécies *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* e *Proteus mirabilis* foram realizados diferentes PCR.

Os PCR foram realizados com um volume final de 25 µL contendo água MiliQ esterilizada, 12,5 µL de Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de cada um dos oligonucleótidos (Tabela 2), e 1,5 µL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (Biometra Tone Series,). Para cada uma das reações foi usado um controlo positivo (estirpe previamente sequenciada) e um controlo negativo (sem DNA). De seguida realizou-se a eletroforese em gel de agarose e a visualização dos produtos de PCR como descrito anteriormente.

Para confirmação do género de *Salmonella* spp. foi utilizado o simplex PCR adaptado de Malorny e colaboradores (2003). A amplificação do gene *invA*, permite identificar a bactéria como *Salmonella* spp. uma vez que é característico deste género (Tabela 2). A reação realizada iniciou-se a desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, à qual se seguiram 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (60 segundos a 60°C) e extensão (60 segundos a 72°C), terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para confirmação da espécie *E. coli* e classificação filogenética foi realizado um multiplex-PCR de acordo com Doumith e colaboradores (2012) onde foi feita a amplificação do gene *gadA*, o qual é característico da espécie *E. coli* e através da amplificação de outros dois genes, *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 (Tabela 2). A reação iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (30 segundos a 72°C), terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para confirmação das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* foi realizado multiplex-PCR de acordo com Padmavathy e colaboradores (2012). Foi realizada a amplificação dos genes *fimK* e *zapA* para identificação das espécies *Klebsilla pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, respetivamente. A reação iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (45 segundos a 94°C), hibridação (60

segundos a 54°C) e extensão (60 segundos a 72°C), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para confirmação da espécie *Klebsiella oxytoca* foi realizado o PCR de acordo com Kovtunovych e colaboradores (2003). Foi realizada a amplificação do gene da poligalacturonase (*pheX*) característico desta espécie (Tabela 2). A reação iniciou-se com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 55°C) e extensão (60 segundos a 72°C), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 2: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de algumas espécies de Enterobacterales.

Gene	Designação do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referência
<i>invA</i>	invAF	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284	Malorny et al. 2003
	invAF	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA		
<i>gadA</i>	gadAF	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAAG	373	
	gadAR	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC		
<i>chuaA</i>	chuaAF	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281	Doumith et al. 2012
	chuaAR	AAACGCGCTCGCGCCTAAT		
<i>yjaA</i>	YjaAF	TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT	216	
	YjaAR	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA		
Fragmento de DNA - TSPE4.C2	TSPE4.C2F	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152	
	TSPE4.C2R	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG		
<i>fimK</i>	KP_fimK_F	TGCTCTATCAGGTGAGTCAT	746	Padmavathy, et al. 2012
	KP_fimK_R	AAAATCGATAGTTTCAGCAT		
<i>zapA</i>	PM_zapA_F	ACCGCAGGAAAACATATAGCCC	540	
	PM_zapA_R	GCGACTATCTTCCGCATAATCA		
<i>pehX</i>	KO_PEH-C	GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG	344	Kovtunovych et al.,2003
	KO_PEH-D	TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG		

Identificação de outras bactérias Gram-negativas

Para identificação de outras espécies de bactérias Gram-negativas, para as quais não foram possíveis identificar pelos PCRs realizados anteriormente, os isolados foram enviados para Laboratório externo (Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Doenças Infeciosas). A identificação foi realizada em VITEK® MS (Biomérieux, França).

Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)

O teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) é um procedimento laboratorial que tem como objetivo a identificação do antibiótico mais eficaz para a bactéria em estudo (Bayot

& Bragg, 2023). Os laboratórios clínicos dispõem atualmente de vários métodos para a realização dos TSA, sendo o mais comum, o método de difusão em disco (MDD) (Bayot & Bragg, 2023).

O MDD consiste na colocação de discos de papel saturados com os antibióticos sobre uma placa de MacConkey agar com a bactéria a testar, previamente semeada na superfície do meio, seguidamente, leva-se a placa a incubar durante $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h}\pm 2\text{h}$. Após este período de incubação confirma-se a presença ou ausência de uma zona de inibição ao redor dos discos e mede-se o diâmetro dos halos obtidos (Horváth *et al.*, 2016).

Para cada isolado obtido e confirmado quanto ao género e espécie, foram testados quanto à suscetibilidade aos antibióticos pelo MDD. Após se efetuar a sementeira numa suspensão com o grau 0,5 da escala de McFarland, correspondente a uma concentração bacteriana entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/ml, em placas de Müller-Hinton Agar (Biokar) de colónias de cultura pura dos vários isolados, foram aplicados os discos de antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

Para os isolados confirmados como *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* foram utilizados os seguintes antibióticos (Oxoid, ampshire, Inglaterra): amicacina (30 µg), ceftazidima (10 µg) cefepime (30 µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipeneme (10 µg), meropenemo (10 µg), piperacilina (30 µg), piperaciclina/tazobactam (36 µg) e tobramicina (10 µg).

Para Enterobacterales foram testados os seguintes antibióticos (Oxoid): ampicilina (10 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (30 µg), amicacina (30µg), ácido nalidixico (30µg), cefotaxima (5 µg), cefoxitina (30 µg), cefepime (30 µg), ceftazidima (10 µg), cloranfenicol (30µg), ciprofloxacina (5 µg), ertapeneme (10 µg), gentamicina (10µg), imipeneme (10 µg), levofloxacina (5 µg), meropenemo (10 µg), piperacilina (30 µg), piperacilina/Tazobactam (36 µg), pefloxacina (5 µg), trimetoprim/sulfametoxazole (25 µg) e tetraciclina (30µg).

Para rastreio da deteção da atividade de carbapenamses nas Enterobacterales foi realizado o teste MAST® CAT-ID (D71C, Mastgroup, Alemanha) com faropenem, seguindo as instruções do fabricante.

Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{h}\pm 2\text{h}$. Os perfis de suscetibilidade antimicrobiana de cada isolado foram interpretados de acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST, 2023) e CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020).

A multirresistência foi definida como resistência a pelo menos três classes de antibióticos. As bactérias foram classificadas como multirresistentes (MDR) de acordo com a classificação proposta por Magiorakos e colaboradores.

Pesquisa e detecção de genes que codificam para ESBLs/AmpC e Carbapenemases

Para os isolados de Enterobacterales com resistência às C3G foi realizada a pesquisa de ESBL e AmpC por diferentes PCRs.

Cada um dos PCRs foi realizado num volume final de 25 μL , contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 μL de Supreme NZY Taq II 2x Green Master Mix (NZYtech, Portugal), 0,5 μM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 3) e 1,5 μL de DNA alvo. Todas as reações foram realizadas em um termociclador (Biometra TOne Series,). Para cada uma das reações foram utilizados um controlo positivo e um controlo negativo. Após obtenção dos produtos de PCR, estes foram submetidos a eletroforese e visualizados conforme descrito anteriormente.

Para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo TEM foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*_{TEM} (Caniça *et al.* 1997). A reação iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (60 segundos a 94°C), hibridação (2 minutos a 56°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C .

Para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo SHV foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*_{SHV} (Rasheed *et al.* 1997). A reação iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (60 segundos a 54°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C .

Para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo CTX-M foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*_{CTX-M} (Edelstein, *et al.* 2003). Começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (60 segundos a 94°C), hibridação (2 minutos a 54°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C .

No caso das amostras positivas para o gene *bla*_{CTX-M-1} foi realizada a amplificação de outras regiões do gene de modo a identificar o grupo a que pertencia, nomeadamente, grupo 1 (*bla*_{CTX-M-1}) e grupo 9 (*bla*_{CTX-M-9}) de acordo com Woodford e colaboradores (2006). O PCR para identificação do gene *bla*_{CTX-M-1} iniciou-se a desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (2 minutos a 58°C) e extensão (1 minuto a 72°C), terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para identificação do gene *bla*_{CTX-M-9} a desnaturação inicial ocorreu a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), hibridação (30 segundos a 59°C) e extensão (1 minuto a 72°C), acabando com uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

A identificação de genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC, foi realizada por multiplex PCR (Pérez-Pérez, Hanson, 2002). Iniciou-se com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 25 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 3: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados no método de PCR para deteção dos genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), cefalosporinases (AmpC) e carbapenemases nos isolados de Enterobacterales.

Gene	Designação do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referencia
<i>TEM</i>	FIN	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	1091	Caniça et al. 1997
	DEB	ATGAGTAAACTTGGTCTGAC		
<i>SHV</i>	SHVf	CGCTTCTTTACTCGCCTTTA	911	Rasheed et al, 1997
	SHVr	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
<i>CTX-M</i>	CTX-MF	TTTGCATGTGTCAGTACCAGTAA	544	Edelstein et al. (2003)
	CTX-MR	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
<i>CTX-M-1</i>	CTX-M-1F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415	Woodford et al. 2006
	CTX-M-1R	AGCTTATTCATCGCCACGTT		
<i>CTX-M-9</i>	CTX-M9F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	205	2006
	CTX-M-9R	ATTGGAAAGCGTTCATCACC		
<i>ACC</i>	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
LAT-1; -3, BIL-1, CMY-2 to -7, -12 to -18, -21 to -23	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	Pérez-Pérez & Hanson (2002)
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
<i>DHA</i>	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	(2002)
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
<i>FOX</i>	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		

ACT-1; MIR-1	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
MOX; CMY-1, -8, -11; -19	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	

Resultados

Identificação de bactérias Gram-negativas em geckos leopardo saudáveis

Neste estudo foram identificadas diferentes espécies de bactérias Gram-negativas nas amostras da cavidade oral e nas da cloaca. Entre as Enterobacterales foram identificadas diferentes espécies na cavidade oral dos animais, entre elas *Salmonella* spp. (22,4 %, n= 11/49); *Klebsiella oxytoca* (2,0%, n=1/49); *Klebsiella pneumoniae* (4,1%, n=2/49); *Klebsiella aerogenes* (2,0%, n=1/49); *Citrobacter freudi* (4,1%, n=2/49); *Pseudocitrobacter faecalis* (2,0%, n=1/49); *Proteus mirabilis* (2,0%, n=1/49); e *Enterobacter cloacae* (2,0%, n=1/49) (Tabela 4; Figura 11). Em relação às bactérias da ordem das Pseudomonadales foram identificadas *Pseudomonas aeruginosa* (22,4%, n=11/49), *Pseudomonas* spp. (10,2%, n=5/49) e *Stenotrophomonas maltophila* (2,0%, n=1/49) (Tabela 4). Em relação à ordem das Enterobacterales na cloaca foram detetadas as seguintes bactérias: *Salmonella* spp. (62,8%, n=27/43); *Escherichia coli* (2,3%, n=1/43); *Klebsiella aerogenes* (9,3%, n=4/43); *Citrobacter freudi* (16,3%, n=7/43), *Proteus mirabilis* (2,3%, n=1/43). Em relação à ordem das Pseudomonadales foram identificadas *Pseudomonas aeruginosa* (18,6%, n=8/43) e outras *Pseudomonas* spp (7,0%, n=3/43) (Tabela 4, figura 11).

Tabela 4: Bactérias Gram-negativas nas amostras da cavidade oral (n=49) e cloaca (n=43) de Geckos Leopardo.

Bactéria Gram-negativa	Cavidade oral % (n)	Cloaca % (n)
<i>Salmonella</i> spp.	22,4 (n=11)	62,8 (n=27)
<i>Escherichia coli</i>	0,0 (n=0)	2,3 (n=1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,0 (n=1)	0,0 (n=0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,1 (n=2)	0,0 (n=0)
<i>klebsiella aerogenes</i>	2,0 (n=1)	9,3 (n=4)
<i>Citrobacter freudi</i>	4,1 (n=2)	16,3 (n=7)
<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	2,0 (n=1)	0,0 (n=0)
<i>Proteus mirabilis</i>	2,0 (n=1)	2,3(n=1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,0 (n=1)	0,0 (n=0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22,4 (n=11)	18,6 (n=8)
<i>Pseudomonas</i> spp.	10,2 (n=5)	7,0 (n=3)
<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	2,0 (n=1)	0,0 (n=0)

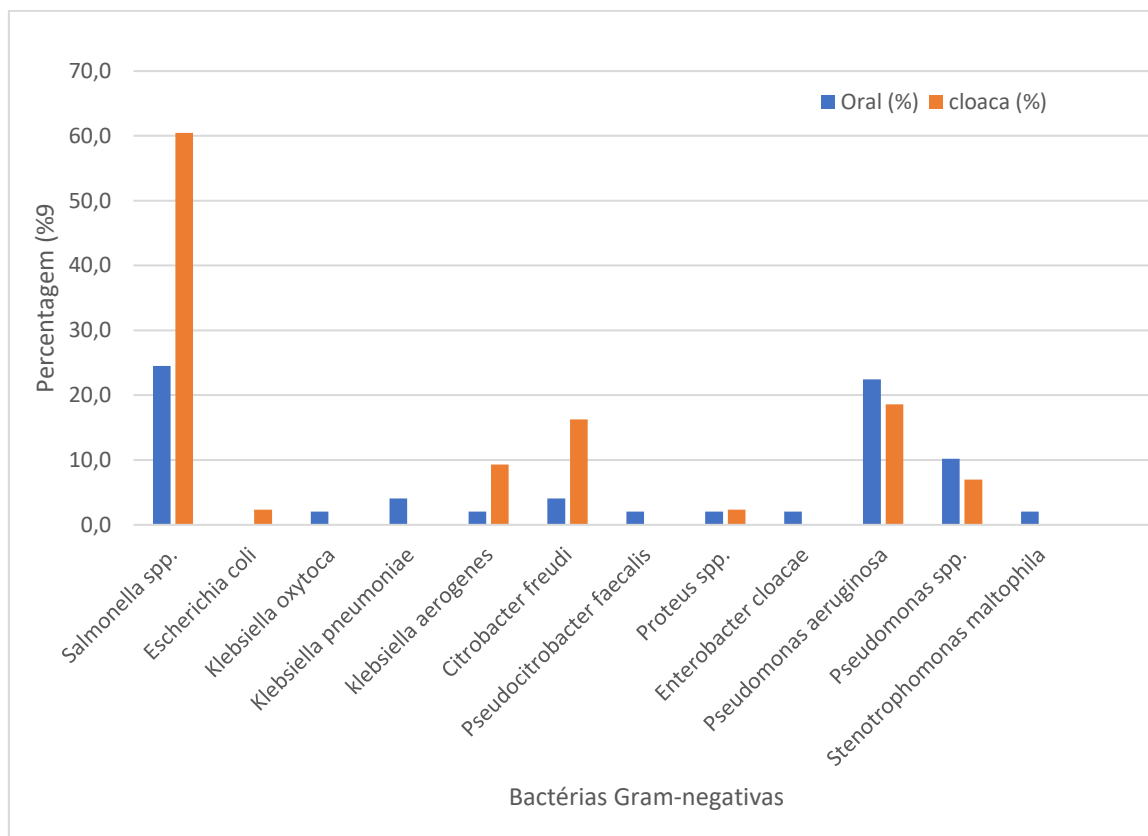


Figura 11: Representação gráfica das bactérias Gram-negativas nas amostras da cavidade oral e cloaca de geckos leopardo.

Em relação a *Salmonella* spp 10,5% (n=4/38) dos animais foram positivos para *salmonella* spp. em ambas as amostras. Em relação à serotipificação de *Salmonella* spp. esta foi realizada em 11 isolados da cavidade oral e em 24 isolados da cloaca, em laboratório externo. Entre os isolados da cloaca os serotipos de *Salmonella* mais frequente foram: *S. enterica salamae* ser. 16:m,t;- (29,2%, n=7), *S. enterica enterica* ser. Fluntern (29,2%, n=7), *S. enterica salamae* ser. 40:g,m,t;- (12,5%, n=3) (Tabela 5). Em relação aos isolados da cavidade oral os serotipos mais frequentes foram igualmente *S. enterica salamae* ser. 16:m,t;- (27,3%, n=3), *S. enterica enterica* ser. Fluntern (18,2%, n=2) e *S. enterica salamae* ser. 40:g,m,t;- (18,2%, n=2) (Tabela 5) (Figura 12).

Tabela 5: Serotipos de *salmonella* spp. identificados na cavidade oral (n=11) e cloaca (n=24) de Geckos leopardo.

Serotipificação de <i>salmonella</i> spp	Cavidade oral % (n)	Cloaca% (n)
<i>S. enterica salamae</i> ser. 16:m,t;-	27,3 (n=3)	29,2 (n=7)
<i>S. enterica enterica</i> ser. Fluntern	18,2 (n=2)	29,2% (n=7)
<i>S. enterica salamae</i> ser. 40:g,m,t;-	18,2 (n=2)	12,5 (n=3)

<i>S. enterica enterica</i> ser. Typhimurium	0 (n=0)	8,3 (n=2)
<i>S. enterica salamae</i> ser. 30:l,z28:z6	0 (n=0)	8,3 (n=2)
<i>S. enterica enterica</i> ser. Tennessee	0 (n=0)	4,2 (n=1)
<i>S. enterica enterica</i> ser. Senftenberg/Dessau	9,1 (n=1)	4,2 (n=1)
<i>S. enterica enterica</i> ser. Adelaide	9,1 (n=1)	0, (n=0)
<i>S. enterica salamae</i> ser. 47:b:e,n,x,z15	9,1 (n=1)	0 (n=0)
<i>S. enterica enterica</i> ser. Mpouto ou <i>S. enterica salamae</i> ser. 16:m,t,-	9,1 (n=1)	4,2 (n=1)

Legenda: ser - serotipo

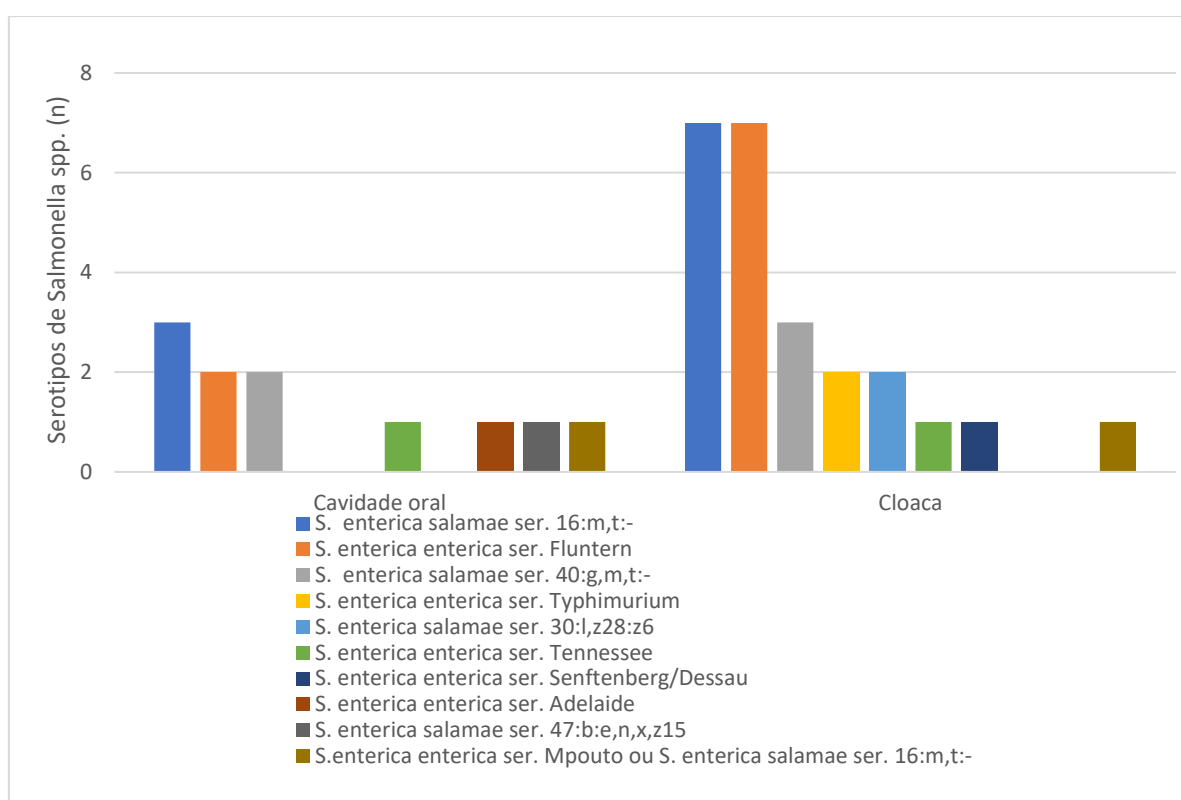


Figura 12: Representação gráfica dos serotipos de *Salmonella* spp. identificados na cavidade oral e cloaca de geckos leopardo.

Teste de suscetibilidade a antibióticos e mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

Para os isolados de *Salmonella* spp. referidos anteriormente foi realizado o teste de suscetibilidade a antibióticos por difusão de disco para 19 antibióticos. Entre os isolados da cavidade oral verificou-se as seguintes resistências: ampicilina (9,1%, n=1/11), ácido nalidixico (18,2%, n=2/11), pefloxacina (18,2%, n=2/11), gentamicina (9,1%, n=1/11) e amicacina

(81,8%, n=9/11) (Figura 13). Para os isolados da cloaca as resistências aos antibióticos foram as seguintes: piperacilina (37,0 %, n=10/27), piperacilina/tazobactam (33,3%, n=9/27), ácido nalidixico (14,8%, n=4/27), pefloxacina (14,8%, n=4/27), gentamicina (7,4%, n=2/27) e amicacina (70,4%, n=19/27) (Figura 13). Em nenhum dos isolados de *Salmonella* spp. foi detetada multirresistência aos antibióticos, apenas resistência a algumas flourquinolonas aminoglicosídeos e betalactâmicos. Não sendo verificada resistência aos CP nem a C3G.

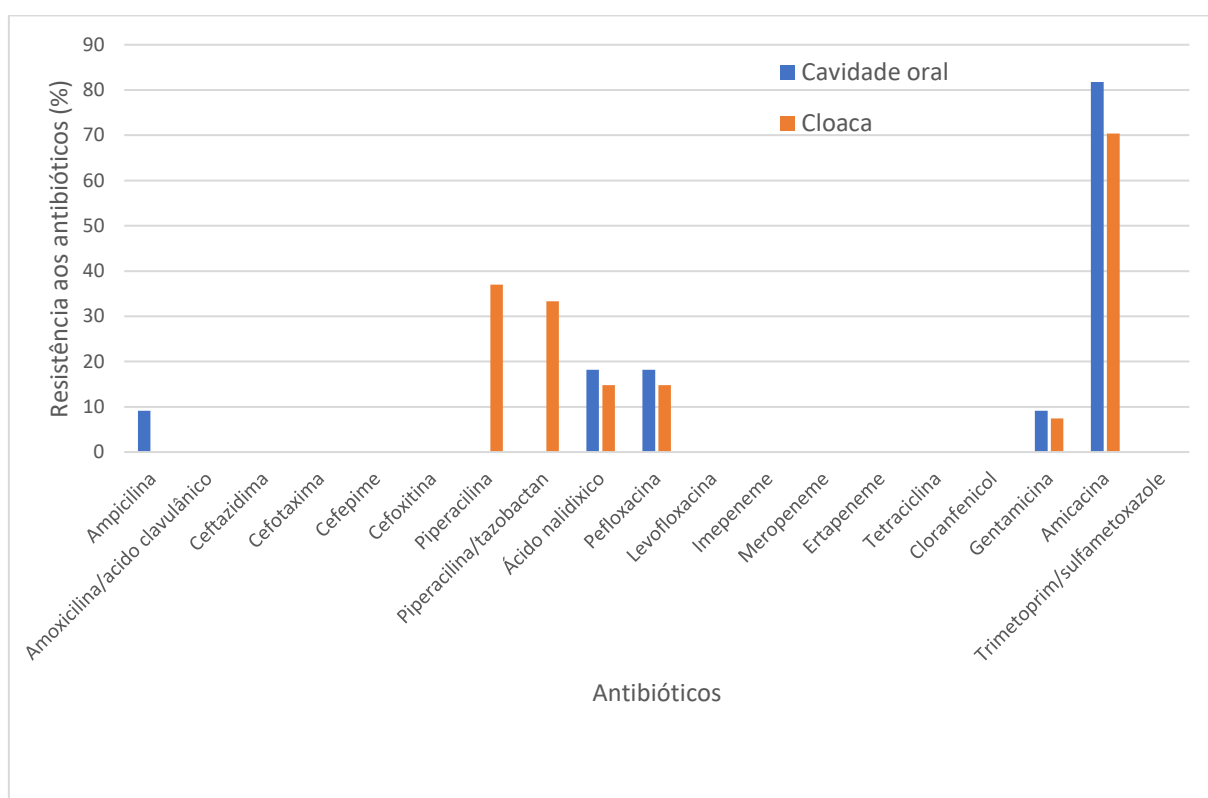


Figura 13: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de *Salmonella* spp. nos geckos leopardo na cavidade oral (n=11) e na cloaca (n=27).

Em relação aos isolados de *Citrobacter freundii* obtidos da cavidade oral (n=2) e da cloaca (n=7) foram testados 17 antibióticos e verificou-se as seguintes resistências: ampicilina (100%), amoxicilina/ácido clavulânico (100%), cefotaxima (100% e 85,7%, respectivamente), ceftazidima (50% e 71,4%, respectivamente), cefoxitina (100%), cefepim (0% e 14,2%, respectivamente), ciprofloxacina (0% e 14,2%, respectivamente), piperacilina (50% e 42,9%, respectivamente) e piperacilina/tazobactam (50% e 42,9%, respectivamente). Nenhum dos isolados foi classificado como multirresistente. (Figura 14).

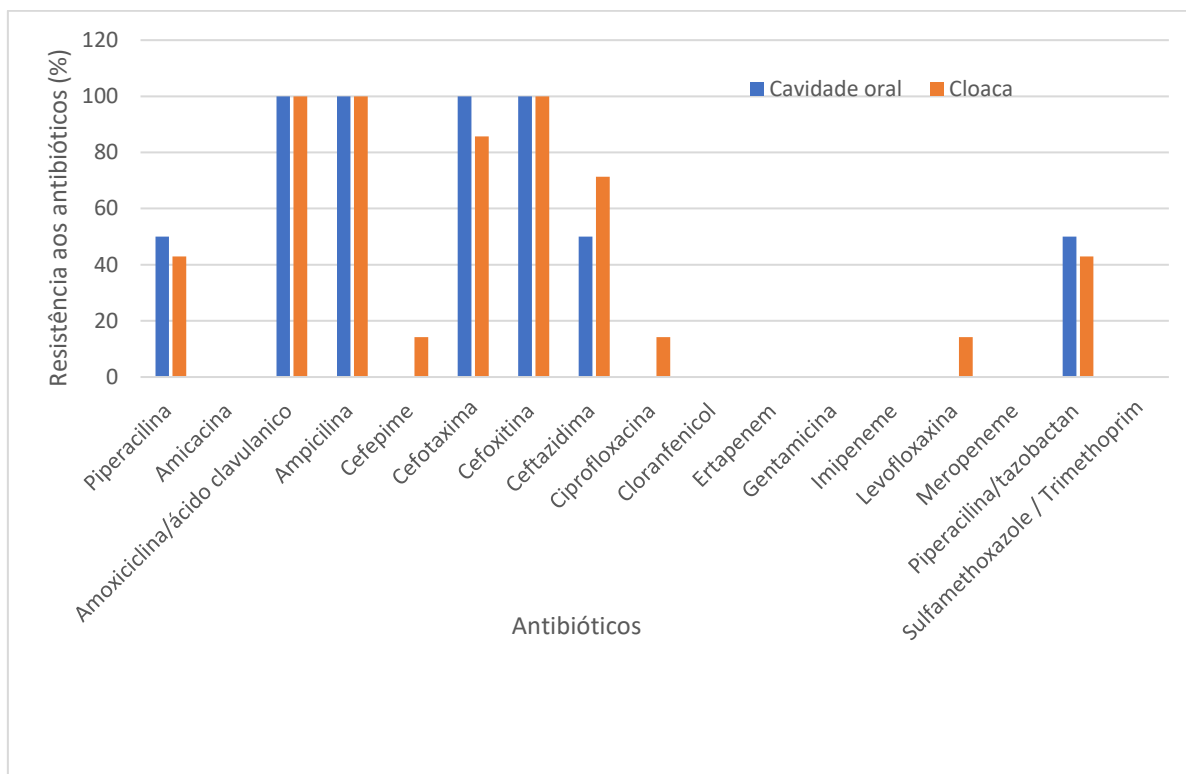


Figura 14: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de *Citrobacter freudi* nos geckos leopardo na cavidade oral (n=2) e na cloaca (n=7).

Em relação aos isolados de *klebsiella aerogenes* obtidos da cavidade oral (n=1) e da cloaca (n=4) foram testados 18 antibióticos e verificou-se a seguinte resistência: ampicilina (100%), amoxicilina/ácido clavulânico (100%), cefotaxima (0% e 50,0%, respetivamente), ceftazidima (100% e 50,0%, respetivamente), cefoxitina (100% e 75%, respetivamente), cefepime (0% e 25,0%, respetivamente), ciprofloxacina (100% e 0%, respetivamente), gentamicina (100% e 0%, respetivamente), levofloxacina (100% e 75%, respetivamente), piperacilina (100% e 75,0%, respetivamente), piperacilina/tazobactam (100% e 0,0%, respetivamente) (Figura 15). Um dos isolados da cavidade oral era multirresistente, apresentando resistência aos beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (gentamicina). Os restantes isolados não apresentaram multirresistência, mas todos eram resistentes às C3G.

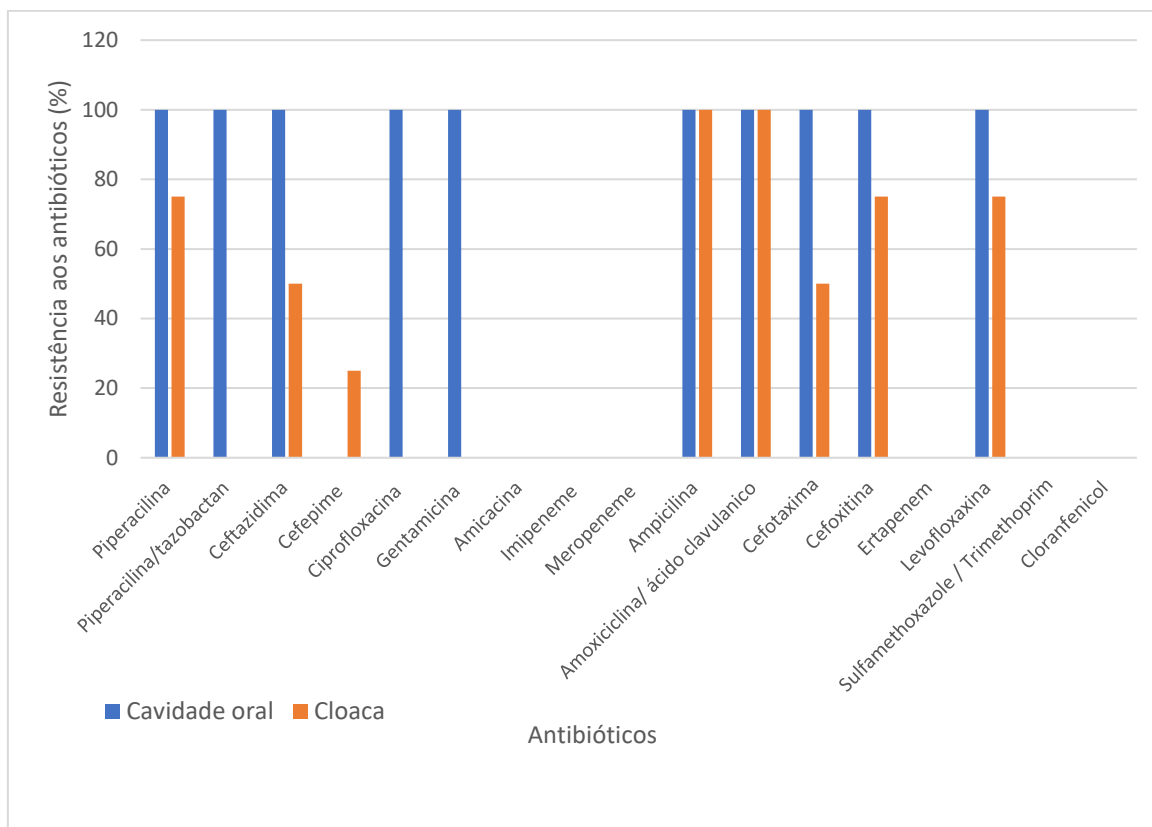


Figura 15: Representação gráfica da resistência aos antibióticos para os isolados de *Klebsiella aerogenes* nos Geckos Leopardo na cavidade oral (n=1) e na cloaca (n=4).

Em relação a *Klebsiella oxytoca* foi apenas isolada uma bactéria da cavidade oral de um dos animais, sendo esta resistente apenas à ampicilina (AMP^R).

Em relação aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos da cavidade oral (n=2) foram testados 18 antibióticos e verificou-se a seguinte resistência: ampicilina (100%), amoxicilina/ácido clavulânico (100%), cefotaxima (50,0%), ceftazidima (50,0%), cefepime (50,0%), ciprofloxacina (50,0%), levofloxaxina (50,0%), sulfamethoxazole/trimethoprim (50,0%), piperacilina (100%), piperacilina/tazobactam (50,0%).

Em relação aos isolados de *Proteus mirabilis* obtidos da cavidade oral (n=1) e da cloaca (n=1) foram testados 18 antibióticos e verificou-se as seguintes resistências: ampicilina (100%), amoxicilina/ácido clavulânico (100%), aztreonam (100% e 0%, respetivamente), cefotaxima (0% e 100%, respetivamente), ceftazidima (100%), cefoxitina (100% e 0%, respetivamente) e piperacilina (0% e 100%, respetivamente).

Neste estudo foi também identificada *Escherichia coli* (pertencendo ao grupo filogenético D), numa amostra da cloaca. Sendo esta suscetível a todos os antibióticos testados.

Neste estudo foram identificados 28,8% (n=17/59) de Enterobacterales resistentes às C3G (Tabela 6). Entre elas foram identificados os seguintes agentes bacterianos: *Pseudocitrobacter faecalis* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Klebsiella pneumoniae* (n=1); *Citrobacter freudi* (n=9). Em relação a *Citrobacter freudi* todos os isolados de ambas as amostras foram resistentes às C3G e nenhum dos isolados foi classificado como multirresistente. Em todos os isolados de *Citrobacter freudi* foi identificado o gene *bla_{CMY}*. Uma *K. pneumoniae* era resistente às C3G e foram detetados os seguintes determinantes de resistência aos antibióticos *bla_{CTX-M-1}* grupo, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. Em relação à espécie *Enterobacter cloacae* foi apenas isolada uma bactéria obtida na cavidade oral e apresentou o seguinte perfil de resistência: AMP^R-AMC^R-CTX^R-CAZ^R-FOX^R-FEP^R-PRL^R-TZP^R (Tabela 6). Entre as Enterobacterales resistentes às C3G 58,8% (n=10/17) foram identificadas bactérias produtoras de ESBLs/AmpC (Tabela 6).

Tabela 6: Enterobacterales resistentes às C3G nos isolados de geckos leopardo.

Identificação da amostra	Tipo de amostra	Enterobacterale	Perfil de resistência antibióticos	de MDR aos	Genes de resistência aos antibióticos
ULHTGA3	Oral	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R - FOX ^R -FEP ^R -PRL ^R - TZP ^R	Não	-
ULHTGA4	Oral	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -FEP ^R - PRL ^R -TZP ^R	Não	<i>bla_{CTX-M-1}</i> grupo, <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{TEM}</i>
ULHTGA4	Cloaca	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AMP ^R -AMC ^R - FOX ^R - FEP ^R -PRL ^R - TZP ^R	Não	-
ULHTGA4	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -	Não	<i>bla_{CMY}</i>

			FOX ^R -PRL ^R -TZP ^R - SXT ^R		
ULHTGA8	Cloaca	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R	Não	-
ULHTGA14	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -FOX ^R	Não	<i>bla_{CMY}</i>
ULHTGA14	Cloaca	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R - FOX ^R -PRL ^R -TZP ^R	Não	-
ULHTGA15	Oral	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R - FOX ^R -PRL ^R -TZP ^R - AK ^R	Não	<i>bla_{CMY}</i>
ULHTGA17	Oral	<i>Pseudocitrobacter faecalis</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R - FOX ^R -FEP ^R	Não	-
ULHTGA22	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - FOX ^R	Não	<i>bla_{CMY}</i>
ULHTGA24	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -FOX ^R	Não	<i>bla_{CMY}</i>
ULHTGA27	Oral	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AMP ^R -AMC ^R - CAZ ^R -FOX ^R - PRL ^R -TZP ^R -CIP ^R - LEV ^R -CN ^R	Sim	-
ULHTGA27	Cloaca	<i>Klebsiella aerogenes</i>	AMP ^R -AMC ^R - FOX ^R -PRL ^R -TZP ^R	Não	-
ULHTGA29	Oral	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R FOX ^R	Não	<i>bla_{CMY}</i>
ULHTGA29	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -	Não	<i>bla_{CMY}</i>

			FOX ^R - PRL ^R CIP ^R - LEV ^R		
ULHTGA30	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R - FOX ^R - PRL ^R - TZP ^R	Não	<i>bla</i> _{CMY}
ULHRGA55	Cloaca	<i>Citrobacter freudi</i>	AMP ^R -AMC ^R - CTX ^R -CAZ ^R -FOX ^R	Não	<i>bla</i> _{CMY}

Legenda: AK- Amicacina, AMC- Amoxicilina/ácido clavulânico, AMP- Ampicilina, CAZ- Ceftazidima, CIP-Ciprofloxacina, CN- Gentamicina, CTX- Cefotaxima, FEP- Cefepime, Fox-Cefoxitina, LEV- Levofloxacina, PRL- Piperacilina, TZP- Piperacilina/tazobactan; R-Resistente.

Em termos de resistências aos antibióticos para a ordem das Pseudomonadales, foi possível verificar que os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* da cavidade oral apresentaram resistência aos seguintes antibióticos: piperacilina (18,2%, n=2), piperacilina/tazobactan (9,1%, n=1), ceftazidima (27,3%, n=3), enrofloxacina (45,5%, n=5), amicacina (9,1%, n=1), tobramicina (18,2%, n=2) e imipenem (9,1%, n=1) (Tabela 7). Quanto aos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* na cloaca observou-se as seguintes resistências: piperacilina (12,5%, n=1), piperacilina/tazobactan (25,0%, n=2), ceftazidima (25,0%, n=2), cefepime (12,5%, n=1), enrofloxacina (62,5%, n=5), gentamicina (25,0%, n=2), tobramicina (12,5%, n=1) e imipeneme (12,5%, n=1), sendo cinco delas multirresistentes (Tabela 9).

Tabela 7: Resistência aos antibióticos para os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. nos Geckos Leopardo na cavidade oral e na cloaca.

Antibiótico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	Cavidade oral	Cloaca	Cavidade oral	Cloaca
	% (n) N=11	% (n) N=9	% (n) N=5	% (n) N=2
Piperacilina	18,2 (n=2)	12,5 (n=1)	20,0 (n=1)	0,0 (n=0)
Piperacilina/tazobactan	9,1 (n=1)	25,0 (n=2)	0,0 (n=0)	33,1 (n=1)
Ceftazidima	27,3 (n=3)	25,0 (n=2)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Cefepime	0 (n=0)	12,5 (n=1)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Enrofloxacina	45,5 (n=5)	62,5 (n=5)	20,0 (n=1)	33,3 (n=1)
Ciprofloxacina	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)

Gentamicina	0,0 (n=0)	25,0 (n=2)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Amicacina	9,1 (n=1)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Tobramicina	18,2 (n=2)	12,5 (n=1)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Imipeneme	9,1 (n=1)	12,5 (n=1)	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)
Meropeneme	0,0 (n=0)	0,0 (n=0)	20,0 (n=1)	0,0 (n=0)
MDR	18,2 (n=2)	25,0 (n=2)	20,0 (n=1)	0, 0 (n=0)

Legenda: MDR: Multirresistente.

Discussão

Neste estudo o principal objetivo foi caracterizar flora Gram-negativa oral e da cloaca em geckos leopardo, uma vez que a grande maioria das infecções em répteis ocorrem por este tipo de bactérias (Divers & Stahl, 2019).

O gênero de bactéria Gram-negativa com maior frequência de isolamento tanto na cavidade oral como na cloaca de geckos leopardo foi *Salmonella* spp (22,4%, 60,5%, respectivamente). Este agente bacteriano é considerado uma componente natural da flora do trato gastrointestinal na maioria dos répteis. Apresenta uma alta diversidade de subespécies e estirpes, entre os quais algumas podem causar infecções em aves, mamíferos, répteis e humanos. A transmissão desta bactéria de répteis para humanos é definida como salmonelose associada a répteis (SAR) ou salmonelose associada a répteis de estimação exóticos (SAREE) e foi observada e descrita em muitos países europeus (Zajac *et al.*, 2020).

Este gênero representa a bactéria associada a répteis mais conhecida pelo público. A infecção por *Salmonella* spp. em répteis normalmente começa entericamente e depois transcolase através do intestino, ocorrendo então a disseminação para outros órgãos. As lesões nestes animais geralmente incluem enterite necrosante, hepatite granulomatosa, osteomielite proliferativa e osteomielite vertebral (Divers & Stahl, 2019). Para além disso, um dos problemas dermatológicos mais comum nos répteis são os abscessos cutâneos e subcutâneos, muitas vezes observado como protuberâncias da pele. Estes podem ocorrer quando os patógenos são introduzidos no tecido por um tumor, parasitas ou por trauma (por exemplo uma mordida ou penetração por corpo estranho), e são frequentemente causados por bactérias oportunistas que podem induzir uma doença sob certas condições e são encontrados no corpo dos répteis saudáveis. Sendo que os poucos estudos sistemáticos que tentam descrever e confirmar a fonte de infecção e os agentes causadores de abscessos em répteis falam maioritariamente em *Salmonella* spp. (Zajac *et al.*, 2020). Num estudo realizado em 2020 na Polónia em geckos leopardo, todos os abscessos testados foram positivos para esta bactéria (Zajac *et al.*, 2020). Contudo, a presença destas bactérias raramente causam doenças nos répteis (Divers & Stahl, 2019), mas as implicações zoonóticas são importantes. A salmonelose no ser humano apresenta-se frequentemente com sinais gastrointestinais, incluindo diarreia aguda, vômitos, febre, dor abdominal, desidratação (Bjelland *et al.*, 2020). Existem casos conhecidos na Europa, mas no geral os números parecem inferiores aos relatados nos Estados Unidos (Bjelland *et al.*, 2020). Estudos epidemiológicos mostraram que 14% ou aproximadamente 280000 dos estimados 2 milhões de casos de salmonelose observados anualmente nos Estados Unidos estavam

associados a tartarugas domésticas, sendo que pelo menos 22% dos casos necessitavam de hospitalização, o que demonstra que esta doença é um grave perigo à saúde (Bjelland *et al.*, 2020). Embora o público no geral esteja geralmente consciente da relação entre tartarugas e *Salmonella* spp., não está tão bem informado sobre a ligação com outros répteis, incluindo lagartos (iguanas verdes, dragões barbudos, geckos de crista, geckos leopardo, dragões de água, entre outros) e cobras (Jacobson & Garner, 2020).

Em casos de salmonelose com sintomatologia clínica em répteis, a terapia empírica com aminoglicosídeos de primeira linha é o tratamento recomendado a fazer, contudo, devido ao uso excessivo de antibióticos, existem agora estirpes que são resistentes aos aminoglicosídeos e podem não ser tão facilmente tratáveis, sendo por isso recomendada a realização de um TSA previamente (Divers & Stahl, 2019).

Para além de *Salmonella* spp., uma outra bactéria Gram-negativa encontrada com elevada frequência nas amostras estudadas foi *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria é uma das espécies mais relevante na medicina de répteis (Divers & Stahl, 2019). Encontra-se frequentemente em amostras tanto de répteis clinicamente saudáveis e como de doentes. Contudo, existem relativamente poucos casos descritos de infeções por *Pseudomonas* spp. em quelónios, contrastando com o que existe descrito em lagartos e cobras (Divers & Stahl, 2019; Jacobson & Garner, 2020). Nos répteis as infeções por *Pseudomonas* spp. podem-se manifestar como lesões locais a lesões tegumentares difusas, orais, na língua, pneumonias e septicemias (Divers & Stahl, 2019; Jacobson & Garner, 2020). Uma estomatite por *Pseudomonas* spp. pode, eventualmente, resultar numa pneumonia por esta mesma bactéria, devido à necrose dos tecidos ou detritos da cavidade oral que são inalados. Para além disso é comum estes agentes bacterianos colonizarem queimaduras de pele (maioritariamente causadas por tapetes ou cabos de aquecimento térmico (Jacobson & Garner, 2020). Quando este tipo de agente bacteriano é encontrado numa lesão de um paciente, deve-se averiguar quais os fatores que possam estar a comprometer o réptil. Para além disso este tipo de bactéria tem impacto zoonótico, uma vez que o ser humano pode contrair infeções por este agente bacteriano por meio do contato direto após arranhões ou mordidas, inalação ou ingestão (Colinon *et al.*, 2010; Divers & Stahl, 2019). No ser humano, uma infeção por *P. aeruginosa* pode causar uma grande variedade de doenças adquiridas como foliculite, feridas perfurantes que levam à osteomielite, pneumonia, otite externa e muitas outras. Também é uma causa importante de infeções nosocomiais, como pneumonia associada à ventilação mecânica e infeções do trato urinário associadas a cateteres. Os reservatórios no ambiente hospitalar incluem água potável, torneiras, escovas de dente,

máquinas de fazer gelo, soluções desinfetantes, sabonetes, equipamentos de terapia respiratória e endoscópios (Wilson & Pandey, 2023).

Neste estudo num dos isolados da cavidade oral foi identificada a bactéria *Pseudocitrobacter faecalis*. Esta bactéria gram-negativa da ordem das Enterobacterales foi descrita pela primeira vez em 2010 e foi encontrada em contexto clínico, num hospital de medicina humana no Paquistão (Kämpfer *et al* 2014). Esse mesmo isolado apresentava resistência aos carbapenemos devido à produção de carbapenemases *NDM-1* (Kämpfer *et al* 2014). Em 2022 este agente bacteriano foi encontrado na China na corrente sanguínea de um paciente humano, sendo esta bactéria produtora de carbapenemases (*OXA-181*) (Shi *et al.*, 2022). O aparecimento de uma infeção da corrente sanguínea adquirida no hospital relacionada com esta *P. faecalis* indica a possibilidade destas bactérias e consecutivamente os seus genes de resistência terem entrado no hospital através da contaminação ambiental ou da cadeia alimentar (Shi *et al.*, 2022).

Até à data não foi encontrada informação acerca desta bactéria Gram-negativa em animais de companhia, incluindo em répteis, nomeadamente em geckos leopardo. Sendo assim para conhecimento nosso é a primeira descrição nesta espécie de animal.

Uma outra Enterobactereaceae identificada neste estudo foi *Proteus mirabilis*. Esta bactéria é comumente encontrada no solo, no esgoto e em fezes de humanos e animais (Crawford & Daum, 2008). Em humanos, as infeções por *Proteus* spp. são mais frequentes em crianças e pessoas imunodeprimidas, e estão associadas a: sepsis, meningite neonatal, infeção do trato urinário e pneumonia (Crawford & Daum, 2008). Em répteis estão descritos vários casos de infeções, no entanto esta documentado um caso de uma *Corallus enydris* que apresentava lesões caseosas no fígado e no pulmão das quais a única bactéria isolada foi *Proteus* spp (Jacobson & Garner, 2020).

Para além das Enterobacterales anteriores mencionadas, foi também identificado *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freudi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. A bactéria *Enterobacter cloacae*, pode ser encontrada em amostras fecais de humanos e animais, solo, água, insetos e alimentos (Buckle, 2015). Para os seres humanos, esta bactéria é problemática se se encontrarem imunodeprimidos, nesses casos pode causar inflamação da pele e dos olhos, endocardite, pneumonia, septicemia, infeções do trato urinário e de feridas e, em recém-nascidos meningite (Buckle, 2015). Esta espécie é também propensa a contaminar vários dispositivos médicos, intravenosos e outros dispositivos hospitalares, contribuindo para

infecções da pele/tecidos moles, do trato urinário e intra-abdominais (Belas et al. 2021). Além disso, *E. cloacae* tem resistências intrínsecas à ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primeira geração (C1G) e cefoxitina devido à produção de AmpC constitutivas (Belas et al. 2021). Para além desta bactéria já ter sido descrita e caracterizada em humanos e em animais de companhia, como o cão ou gato, já foi descrita em cobras, tartarugas e ovos de tartarugas (Abba et al., 2016; Ebani, 2023).

Em relação ao *Citrobacter freudi* este está associado a várias infecções oportunistas, como diarreias graves, infecções do trato urinário, pneumonias, meningites neonatais e abscessos no cérebro. É uma bactéria patogénica associada à libertação de toxinas, proteólise, hemólise e a formação de biofilmes (Hossain et al., 2017). É uma bactéria frequente em répteis, principalmente associada a infecções em tartarugas. É conhecido como agente etiológico da doença ulcerativa cutânea septicémica, que se caracteriza por anorexia, letargia, necrose e hemorragias petequiais na parte externa do corpo (Hossain et al., 2017). Um estudo realizado em 2017 demonstrou que esta bactéria é frequente (87,5%, n=49/56) em amostras fecais de tartarugas (*Trachemys scripta*) saudáveis. Esta frequência elevada indica que apesar de os animais serem saudáveis estes são portadores destas bactérias patogénicas, podendo transmiti-las das suas fezes para outros animais e para os humanos (Hossain et al., 2017). Para além de patogénico este agente bacteriano é caracterizado por ser produtor de cefalosporinases (β -lactamase AmpC), tendo assim resistências aos β -lactâmicos. Neste estudo os isolados de *Citrobacter freudi* apresentaram resistências às C3G, o que vai ao encontro de outros trabalhos realizados anteriormente (Barlow & Hall, 2002).

Neste estudo obteve-se uma baixa frequência de *E. coli*, apenas 2,3% (n=1/43) isolada da cavidade oral, contudo este isolado é patogénico, pertencendo ao grupo filogenético D. Nos humanos e nos animais é um habitante do trato gastrointestinal comum. No entanto, num estudo realizado em 2003 na Austrália, referem que é mais provável isolar *E. coli* em mamíferos omnívoros do que com outras dietas (Gordon & Cowling, 2003), contrastando com um estudo realizado no Brasil que refere que os animais com dieta carnívora, neste caso cobras, foram os que apresentaram maiores taxas de isolamento desta bactéria (Ramos et al., 2019). Existem vários estudos sobre *E. coli* isolada em seres humanos, mamíferos e aves (Gopee et al. 2000; Nowaczek et al. 2021; Gameda et al., 2023; Karczmarczyk et al., 2011), contudo a informação disponível sobre ocorrência e as características fenotípicas e genotípicas de *E. coli* em répteis são escassas (Bruhl-Day et al., 2014; Gopee et al., 2000; Unger et al., 2017). E outros estudos

de *E. coli* em geckos leopardo são nulos para nosso conhecimento. No entanto, num estudo realizado por Gopee e colaboradores (2000) foi registado uma elevada frequência de *E. coli* em *Crocodylidae* (83,3%), contudo em tartarugas (68,08%) e cobras (37,5-51,1%, dependendo da família) a frequência diminuiu e em lagartos (33,3%) baixou drasticamente. Contudo, num outro estudo realizado por Dec e colaboradores (2022) detetaram uma maior frequência de *E. coli* em répteis herbívoros (66,7%) do que em répteis carnívoros (46,4%) (Dec *et al* 2022). Em termos de virulência 65% dos isolados estavam associados ao grupo B1 e apenas 6,2% ao grupo D (Dec. *et al.* 2022). Apesar da sua dieta e do facto de serem sáurios, seria de esperar uma maior frequência de isolamento desta bactéria.

Para além das bactérias descritas anteriormente, um outro género de interesse clínico é o género *Klebsiella* spp., principalmente as espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. *Klebsiella* spp. encontra-se na natureza, em águas superficiais, esgotos, solo e material vegetal, no trato gastrointestinal de mamíferos e répteis saudáveis (Vetere *et al* 2021). Neste estudo, a frequência de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* foi baixa. Contudo, *K. pneumoniae* tem sido associada a vários processos infecciosos em animais, incluindo nos répteis (Vetere *et al.*, 2021). Esta bactéria foi isolada em diferentes espécies (como dragões barbudos e tartarugas) (Jacobson & Garner, 2020; Vetere *et al.*, 2021). Os humanos servem como reservatório primário de *Klebsiella pneumoniae*, na comunidade em geral 5% a 38% dos indivíduos são portadores desta bactéria nas fezes e 1% a 6% na nasofaringe (Ashurst & Dawson, 2023). Os principais meios de infeção são o trato gastrointestinal do paciente e as mãos do pessoal hospitalar. No entanto em humanos hospitalizados, a taxa de portadores de *K. pneumoniae* é muito maior do que na comunidade (taxas até 77% podem ser observadas nas fezes de pessoas hospitalizadas), estando isto relacionado com o número de antibióticos administrados (Ashurst & Dawson, 2023). A *K. pneumoniae* é uma das bactérias que agora apresentam uma alta taxa de resistência a antibióticos devido á produção de ESBLs (Ashurst & Dawson, 2023)

Por sua vez, a *K. oxytoca* em répteis, quando patogénica, está associada a encefalites bacterianas em cobras e sáurios, e é descrita como responsável por abscessos num caso de septicemia em crocodilos. (Jacobson & Garner, 2020) Em 2020, foi relatado também um caso de uma pericardite supurativa por *K. oxytoca* num *Chamaeleo calyptratus*, sendo este o primeiro registo desta doença por parte desta bactéria em toda a ordem *Squamata*. Em mamíferos, incluindo humanos, esta bactéria também ocorre como comensal, e caso haja uma baixa de imunidade, pode ser responsável por uma variedade de patologias, desde septicemias

a infecções nosocomiais que podem levar a surtos hospitalares (Garcês *et al.*, 2020). Em 2016 foi realizado um estudo para identificar a prevalência de *K. oxytoca* em *Anolis carolinensis*, e os autores detetaram que 17% (n=7/42) dos animais incluídos no estudo foram positivos para *K. oxytoca*, demonstrando assim que estes animais são uma fonte potencial de infecção desta bactéria para humanos (Jackson, 2016). Assim sendo, outros sáurios como os geckos leopardo, também se podem tornar fontes de infecções zoonóticas desta bactéria. O risco de infecção numa pessoa saudável é baixo, no entanto, as pessoas com sistema imunológico mais fraco são mais vulneráveis. Estar hospitalizado também aumenta o risco de uma pessoa desenvolver uma infecção por esta bactéria, especialmente se tiver uma ferida aberta, estiver a usar um ventilador ou se estiver com um cateter intravenoso (Seladi-Schulman, 2023).

Neste estudo a espécie de *Klebsiella* spp identificada com maior frequência foi *Klebsiella aerogenes*. Existe pouca informação disponível sobre *K. aerogenes* em reptéis. Em medicina humana estão maioritariamente relacionadas com infecções do trato respiratório, trato gastrointestinal, trato urinário e infecções sanguíneas. Em comparação com outras espécies de *Enterobacteriaceae*, *K. aerogenes* tem maior probabilidade de causar choque séptico ou até morte em pacientes humanos, tendo sido também relatado em 2022 o primeiro caso de uma infecção lombar causada por *K. aerogenes* (Gu *et al.*, 2022). Uma destas bactérias era multirresistente, sendo a única bactéria da ordem das Enterobacterales multirresistente neste estudo, tendo por isso um maior significado e importância.

Neste estudo foram identificadas 28,8% (*Citrobacter freudi* (n=9), *Enterobacter cloacae* (n=1) e *Klebsiella pneumoniae* (n=1) *Klebsiella aerogenes* (n=5)) de Enterobacterales resistentes às C3G em que 58,8% (n=10/17) foram identificadas bactérias produtoras de ESBLs/AmpC. Esta produção de enzimas que têm a capacidade de hidrolisar penicilina, cefalosporinas e monobactams explica as resistências observadas aos antibióticos destes grupos, sendo ainda uma percentagem significativa, é uma informação que não deve ser menosprezada pois está provada a transmissão de bactérias com estes genes intraespecífica e interespecificamente (Urban-Chmiel *et al.*, 2022; Toombs-Ruane *et al.*, 2020). É problemático também o facto das resistências aos carbapenemos sendo que estes são considerados antibióticos de último recurso contra bactérias tanto gram-positivas como gram-negativas, devido ao seu largo espectro de atuação (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

Conclusão

Neste estudo, numa perspetiva de “One health”, com uma amostragem de 56 animais, obtiveram-se resultados que contribuem para um melhor conhecimento sobre a microbiota Gram-negativa comensal oral e fecal em geckos leopardo saudáveis, bem como a prevalência e epidemiologia dos patogénios, deteção de bactérias MDR e Enterobacterales produtoras de ESBLs/AmpC e o seu potencial papel como reservatórios na área de Lisboa.

Os objetivos delineados foram plenamente alcançados, revelando a presença de diversas espécies bacterianas diferentes, incluindo *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freudi*, *Pseudocitrobacter faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*.

Os resultados obtidos são os primeiros descritos nestes animais, oferecendo assim uma grande contribuição para a comunidade científica, demonstrando que os geckos leopardo, um dos reptéis mais comuns como animal de estimação e com mais interação com os tutores, podem ser reservatórios de bactérias zoonóticas e multirresistentes.

Assim, é de destacar a importância de uma correta abordagem “One health”, por parte dos médicos veterinários, tutores de animais de estimação e profissionais de saúde humana no contacto, manejo e cativeiro destes animais, e principalmente devem ser adotadas medidas rigorosas de higiene do lado dos tutores, quebrando assim as possíveis cadeias de transmissão dessas bactérias para outros animais ou humanos.

No entanto, para completar mais este trabalho, mais dados podem ser trabalhados, expandindo e aprofundando assim o conhecimento e informação disponível sobre esta temática, por exemplo, realizar a mesma caracterização da flora microbiana, mas para bactérias gram-positivas.

Bibliografia

- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Amaral, C. B., Alves, A. C. C., Peroba, S. C., & Martins, I. V. F. (2021). Coproparasitologic survey of gastrointestinal parasites in a captive leopard geckos collection (*Eublepharis macularius*). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100617>
- Ashurst, J. V., & Dawson, A. (2023). *Klebsiella Pneumonia*. In StatPearls. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30273394>
- Bayot, M. L., & Bragg, B. N. (2023). Antimicrobial Susceptibility Testing. In StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>
- Belas, A., Marques, C., Menezes, J., Gama, L. T. Da, Cavaco-Silva, P., & Pomba, C. (2022). ESBL/pAmpC-Producing *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections in Non-Related Companion Animals and Humans. *Antibiotics*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050559>
- Belas, A., Menezes, J., Gama, L. T., & Pomba, C. (2020). Sharing of Clinically Important Antimicrobial Resistance Genes by Companion Animals and Their Human Household Members. *Microbial Drug Resistance*, 26(10), 1174–1185. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0380>
- Bjelland, A. M., Sandvik, L. M., Skarstein, M. M., Svendal, L., & Debenham, J. J. (2020). Prevalence of *Salmonella* serovars isolated from reptiles in Norwegian zoos. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0502-0>
- Boyer, T. H., Garner, M.M., Reavill D.R., Steffes Z.J., (2013). *Leopard Gecko Diseases and Care*. https://newcms.eventkaddy.net/event_data/60/session_files/AV013_Conference_Note_jjacobs_cvma.net_AV013BOYERLeopardGeckoDiseasesandCare_20150512213140.pdf

- Bruhl-Day, R., John-Sylvester, K. D., Hariharan, H., B Sylvester, W. R., Amadi, V., Hegamin-Younger, C., Pinckney, R., L Macpherson, C. N., McKibben, J. S., Sylvester, R. B., & John-Sylvester, K. (2014). Occurrence of Antibiotic Resistant *Escherichia Coli* in Green Iguanas (Iguana Iguana) in Grenada, West Indies. *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*, 2014. <https://doi.org/10.5171/2014.260412>
- Buckle, J. (2015). Infection. In *Clinical Aromatherapy* (pp. 130–167). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5440-2.00007-3>
- Casey, C. L., Hernandez, S. M., Yabsley, M. J., Smith, K. F., & Sanchez, S. (2015). The carriage of antibiotic resistance by enteric bacteria from imported tokay geckos (Gekko gecko) destined for the pet trade. *Science of The Total Environment*, 505, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.102>
- Crawford, S. E., & Daum, R. S. (2008). Bacterial Pneumonia, Lung Abscess, and Empyema. In *Pediatric Respiratory Medicine* (pp. 501–553). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-032304048-8.50039-6>
- DTU food Nacional food Institute (2023). EU reference laboratory-Antimicrobial Resistance-protocols. Disponivel em <https://www.eurl-ar.eu>. Consultado em abril 2023.
- De Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *pseudomonas aeruginosa*. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Divers, J. S., & Stahl, J. S. (2019). *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. (3rd ed.). Elsevier.
- Garcês, A., Soeiro V., Lóio S., Silva F., & Pires I. (2020). Suppurative pericarditis in Veiled Chameleon (*Chamaeleo calyptratus*, Duméril & Duméril 1851) by *Klebsiella oxytoca*. *Herpetology Notes*, 13, 449–450.
- Gemeda, B. A., Wieland, B., Alemayehu, G., Knight-Jones, T. J. D., Wodajo, H. D., Tefera, M., Kumbe, A., Olani, A., Abera, S., & Amenu, K. (2023). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolates from Livestock and the Environment in Extensive Smallholder Livestock Production Systems in Ethiopia. *Antibiotics*, 12(5), 941. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050941>

- Gopee, N. V., Adesiyun, A. A., & Caesar, K. (2000). A longitudinal study of *Escherichia coli* strains isolated from captive mammals, birds, and reptiles in Trinidad. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine : Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 31(3), 353–360. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0353:ALSOEC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0353:ALSOEC]2.0.CO;2)
- Gordon, D. M., & Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*, 149(12), 3575–3586. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>
- Gould, A., Molitor, L., Rockwell, K., Watson, M., & Mitchell, M. A. (2018). Evaluating the Physiologic Effects of Short Duration Ultraviolet B Radiation Exposure in Leopard Geckos (*Eublepharis macularius*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 28(1), 34–39. <https://doi.org/10.5818/17-11-136.1>
- Gu, H., Cai, Q., Dai, X., Wang, H., Xu, W., Cao, X., & Ye, Y. (2022). A case report of *Klebsiella aerogenes*-caused lumbar spine infection identified by metagenome next-generation sequencing. *BMC Infectious Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07583-0>
- Horváth, Gy., Bencsik, T., Ács, K., & Kocsis, B. (2016). Sensitivity of ESBL-Producing Gram-Negative Bacteria to Essential Oils, Plant Extracts, and Their Isolated Compounds. In *Antibiotic Resistance* (pp. 239–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00012-5>
- Hossain, S., Wimalasena, S. H. M. P., & Heo, G. J. (2017). Virulence factors and antimicrobial resistance pattern of *Citrobacter freundii* isolated from healthy pet turtles and their environment. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10–16. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.10.16>
- J Shetty, P. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001234>
- Jackson, K. A. (2016). Prevalence of *Klebsiella oxytoca* in *Anolis carolinensis* of Louisiana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(12), 800–801. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2023>

- Jill Seladi-Schulman. (2023). *Klebsiella oxytoca* infection: What you should know. *Medical News Today*.
- Karczmarczyk, M., Abbott, Y., Walsh, C., Leonard, N., & Fanning, S. (2011). Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Animals Presenting at a University Veterinary Hospital. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7104–7112. <https://doi.org/10.1128/AEM.00599-11>
- Kwon, J., Kim, S. G., Kim, H. J., Giri, S. S., Kim, S. W., Lee, S. Bin, & Park, S. C. (2021). Bacteriophage as an alternative to prevent reptile-associated *Salmonella* transmission. *Zoonoses and Public Health*, 68(2), 131–143. <https://doi.org/10.1111/zph.12804>
- Kubiak, M. (2021) *Handbook of Exotic Pet Medicine*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, pp. 241–263.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Papenfuss, T., Shafiei Bafti, S., & Sharifi, M. (2021). *Eublepharis macularius*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2021*.
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440–458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Ramos, C. P., Santana, J. A., Morcatti Coura, F., Xavier, R. G. C., Leal, C. A. G., Oliveira Junior, C. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S. (2019). Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *BioMed Research International*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/9530732>

- R. Jacobson E. & M. Garner M. (2020). *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles* (E. R. Jacobson & M. M. Garner, Eds.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429155567>
- Sharif Khan, M. (2009). *Natural history and biology of hobbyist choice leopard gecko *Eublepharis macularius**.
- Shi, Q., Guo, Y., Yang, Y., Wu, S., Han, R., Ding, L., Yin, D., & Hu, F. (2022). Characterization of the First Carbapenem-Resistant *Pseudocitrobacter faecalis* Harboring blaOXA-181 in China. *Antibiotics*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060737>
- Silva, D., Domingues, S., Dec, M., Stepien-Pysniak, D., Szczepaniak, K., Turchi, B., & Urban-Chmiel, R. (2022). *Virulence Profiles and Antibiotic Susceptibility of Escherichia coli Strains from Pet Reptiles*. <https://doi.org/10.3390/pathogens>
- Smith, K. F., Yabsley, M. J., Sanchez, S., Casey, C. L., Behrens, M. D., & Hernandez, S. M. (2012). *Salmonella* Isolates from Wild-Caught Tokay Geckos (*Gekko gecko*) Imported to the U.S. from Indonesia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *12*(7), 575–582. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0899>
- Stevens Supervisors, Y., Bruins, E., & Rolf Hoekstra, A. (2008). *Sperm competition in leopard geckos, *Eublepharis macularius*. Does mating order affect paternity?*
- Toombs-Ruane, L. J., Benschop, J., French, N. P., Biggs, P. J., Midwinter, A. C., Marshall, J. C., Chan, M., Drinković, D., Fayaz, A., Baker, M. G., Douwes, J., Roberts, M. G., & Burgess, S. A. (2020). Carriage of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and AmpC Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains from Humans and Pets in the Same Households. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(24). <https://doi.org/10.1128/aem.01613-20>
- Unger, F., Eisenberg, T., Prenger-Berninghoff, E., Leidner, U., Ludwig, M.-L., Rothe, M., Semmler, T., & Ewers, C. (2017). Imported reptiles as a risk factor for the global distribution of *Escherichia coli* harbouring the colistin resistance gene *mcr-1*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *49*(1), 122–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.007>
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wiczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

- Vetere, A., Bertocchi, M., Pelizzone, I., Moggia, E., Gerosa, S., & Di Ianni, F. (2021). Klebsiella sp.-related infectious spondylitis in a bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *BMC Veterinary Research*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02933-7>
- Wendt, M., Silva, B. C. J., & Heo, G.-J. (2017). Virulence Factors and Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Pet Turtles. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(4), 205–211. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.205.211>
- Whitby, C. (2022). *A microbial solution to oil sand pollution: Understanding the microbiomes, metabolic pathways and mechanisms involved in naphthenic acid (NA) biodegradation* (pp. 231–287). <https://doi.org/10.1016/bs.aacr.2022.10.001>
- Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield: comparison with spectrophotometry, fluorometry and qPCR. *BioTechniques*, 72(4), 155–158. <https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>