ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de animais exóticos

Sandro Silva Cardoso

Coimbra, julho 2020

ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de animais exóticos

Coimbra, julho 2020

Sandro Silva Cardoso

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:
Prof.ª Doutora Sofia Duarte

Arguente:
Prof.ª Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Orientador:
Prof.ª Doutora Maria Eduarda Moreno Silveira

Orientador Interno
Prof.ª Doutora Maria Eduarda Moreno Silveira

Coorientador Interno
Prof. Doutor Sérgio Eduardo Ramalho de Sousa

Coorientador Interno
Dr. Hélder Craveiro

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos

Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Hygia pecoris, salus populi

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios, sem os quais teria sido muito mais difícil concluí-la e por esse motivo agradeço de forma particular, expressando a minha eterna gratidão:

à Professora Doutora Eduarda Silveira, minha orientadora, pelo apoio incondicional, tendo sido um pilar fundamental deste meu trabalho. Expresso aqui o meu reconhecimento pela dedicação, preocupação, pelo saber que me transmitiu, pela forma amiga e alegre com que sempre me incentivou e ajudou e também pelo estímulo incutido após cada conversa, fazendo com que me sentisse mais motivado e com as "baterias recarregadas", permitindo assim a realização desta dissertação;

de igual forma, agradeço ao meu co-orientador, Professor Doutor Sérgio Sousa, por me ter acompanhado nesta etapa, partilhando o seu conhecimento científico e a sua disponibilidade inigualável;

ao co-orientador, Professor Doutor Hélder Craveiro, pelo seu apoio;

à Doutora Aurélie Le Loc'h, Médica Veterinária, do Labo NAC - Toulouse, que ao conceder-me acesso aos seus dados permitiu a realização desta dissertação;

às equipas da Equicare em Coimbra, do Centro Veterinário do Oeste em Leiria, da *Clinique Veterinaire Medicabanis* e da *Clinique des NAC* em França, por me terem recebido, ao longo desta etapa com tão grande significado no meu percurso académico e por terem partilhado o seu conhecimento, contribuindo assim para o meu enriquecimento profissional e pessoal;

aos meus amigos que de uma forma geral me apoiaram sempre, apesar de terem permitido que eu perdesse dois pares de óculos graduados! Graças a eles sempre me senti amparado e orientado no meu percurso académico. Aproveito este momento para abrir o meu coração e expressar a minha imensa gratidão: se eventualmente lerem este parágrafo, quero que saibam que estarei sempre aqui disponível para vocês!

Não poderia deixar de expressar um agradecimento muito especial à minha família por toda a alegria e carinho que sempre me transmitiram ao longo da vida.

Agradeço à minha namorada, por ter caminhado ao meu lado neste percurso académico, pelo seu carinho, paciência e ajuda durante a elaboração da presente dissertação.

Aos meus pais dirijo o maior dos agradecimentos e dedico-lhes este trabalho! À minha Mãe pelo alento nos momentos mais difíceis, por todo o amor e apoio incondicional e claro por todos os valores transmitidos ao longo da minha educação. Por último, e tendo consciência que sozinho nada disto teria sido possível, agradeço eternamente ao meu Pai, que tenho a sorte de ser o meu melhor amigo, foi o primeiro a acreditar nas minhas capacidades e a apoiar a minha paixão pelo Reino Animal. Agradeço

pelo amor e carinho infinitos, por todo o seu esforço pessoal e profissional, que possibilitou que eu pudesse frequentar o curso dos meus sonhos e por ser um modelo de coragem e sucesso, permitindo-me assim superar todos os obstáculos ao longo deste percurso.

Por fim, apresento os meus profundos agradecimentos à Escola Universitária Vasco da Gama, por todo o acompanhamento ao logo das diferentes etapas do meu percurso académico e por me ter permitido a realização deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS ..... **v**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **viii**

ÍNDICE DE GRÁFICOS ..... **ix**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **x**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xi**

RESUMO **2**

ABSTRACT **3**

1. INTRODUÇÃO GERAL **4**

2. OBJETIVO **10**

3. MATERIAL E MÉTODOS **10**

3.1. DESENHO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 10

3.2. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS E ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS 13

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA 14

4. RESULTADOS **15**

4.1. BACTÉRIAS DE GRAM-NEGATIVO 15

4.2. BACTÉRIAS DE GRAM-POSITIVO 22

5. DISCUSSÃO **30**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **33**

ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES **38**

ANEXO II. LICENÇAS DE UTILIZAÇÃO DE FIGURAS **47**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Dados cronológicos sobre a descoberta de antimicrobianos 4
Figura 2 - Cronologia da descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos *versus* resistências e novas abordagens de diagnóstico e terapêutica do séc. XX ao séc. XXI 5
Figura 3 - Mecanismo de ação de diferentes classes de antibióticos no alvo celular bacteriano 6
Figura 4 - Diagrama comparativo entre as cinco famílias de Bombas de Efluxo 8
Figura 5 - Lista das bactérias prioritárias para pesquisa de novos antibióticos 9

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Caracterização da amostra consoante os grupos de bactérias e de animais 12
Gráfico 2 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Escherichia coli* no triénio de 2017 a 2019 16
Gráfico 3 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterobacter* spp. no triénio de 2017 a 2019 ... 17
Gráfico 4 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Klebsiella* spp. no triénio de 2017 a 2019 18
Gráfico 5 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Proteus* spp. nos anos de 2017 e 2018 19
Gráfico 6 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Serratia* spp. nos anos de 2018 e 2019 19
Gráfico 7 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* no triénio de 2017 a 2019 20
Gráfico 8 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Pasteurella* spp. no triénio de 2017 a 2019..... 21
Gráfico 9 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus aureus* no triénio de 2017 a 2019 23
Gráfico 10 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus epidermidis* nos anos 2017 e 2018 24
Gráfico 11 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus xylosus* nos anos 2017 e 2018 25
Gráfico 12 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus* spp. no triénio de 2017 a 2019 26
Gráfico 13 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Streptococcus* spp. no triénio de 2017 a 201927
Gráfico 14 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterococcus faecalis* no triénio de 2017 a 2019 28
Gráfico 15 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterococcus* spp. nos anos 2017 e 2018 29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Dimensão da amostra de bactérias de Gram-negativo isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves 10
Tabela 2 - Dimensão da amostra de bactérias de Gram-positivo isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves 12
Tabela 3 - Antibióticos utilizados para o estudo da suscetibilidade e respetiva concentração 14

ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES 38

Tabela Suplementar 1 - Número de isolados consoante a espécie/género animal 39

Tabela Suplementar 2 - Número de isolados associados a diversas patologias e origem da amostra biológica..... 40

Tabela Suplementar 3 - Número de isolados de bactérias de Gram-negativo com perfil de resistência a antibióticos..... 41

Tabela Suplementar 4 - Número de isolados de bactérias de Gram-positivo com perfil de resistência a antibióticos..... 42

Tabela Suplementar 5 - Número de bactérias de Gram-negativo MDR isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves 43

Tabela Suplementar 6 - Número de bactérias de Gram-positivo MDR isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves 44

Tabela Suplementar 7 - Perfil fenotípico de resistências em bactérias de Gram-negativo MDR a diferentes classes de antibióticos..... 45

Tabela Suplementar 8 - Perfil fenotípico de resistências em bactérias de Gram-positivo MDR a diferentes classes de antibióticos.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina com ácido clavulânico
AMR	Antimicrobial Resistance
AZM	Azitromicina
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CFT	Ceftiofur
CFX	Cefalexina
CHL	Cloranfenicol
CLD	Clindamicina
d.C.	Depois de Cristo
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOX	Doxiciclina
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EEA	European Environment Agency
EFSA	European Food Safety Authority
EGM	Elementos Genéticos Móveis
EMA	European Medicines Agency
ENR	Enrofloxacina
ESBL	Extended Spectrum β-lactamases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Food and Agriculture Organization
FLF	Florfenicol
GEN	Gentamicina
Maldi-Tof	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight
MDR	Mutidrug Resistant
MRB	Marbofloxacina

MRSA	Meticillin Resistant *Staphylococccus aureus*
OIE	World Organisation for Animal Health
P	Penicilina G
p	Probabilidade de significância
PBP	Penicillin-Binding-Protein
PBP's	Penicilin-Binding-Proteins
PDR	Pan-Drug Resistant
R	Resistente
RNA	Ribonucleic acid
S	Suscetível
spp.	Espécie
SXT	Sulfonamida-trimetoprim
t	Toneladas
TET	Tetraciclina
THG	Transferência Horizontal de Genes
TIA	Tiamulina
TSA	Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos
ug	Microgramas
v.g.	*verbi gratia*
VRE	Vancomycin Resistant Enterococcus
WHO	World Health Organization

Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de animais exóticos

Sandro Cardoso [a], Aurélie Le Loc'h [b], Hélder Craveiro [a], Sérgio Sousa [a;c], Eduarda Silveira [a;c]

[a] Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

[b] LABO NAC, 17 Impasse Teynier, 3100, Toulouse, França (labo.nac@gmail.com)

[c] Centro de investigação Vasco da Gama (CIVG), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal

(sandromerri@hotmail.com); (vethelder.craveiro@gmail.com); (ramalhosousa@gmail.com); (eduardamorenosilveira@gmail.com)

RESUMO

Os antimicrobianos são ferramentas importantes para o tratamento de doenças bacterianas infeciosas nas medicinas humana e veterinária. O uso abusivo dos antimicrobianos contribuiu para a crescente ameaça da resistência antimicrobiana (AMR). Atualmente, a resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações na saúde pública.

Espécies exóticas têm sido descritas como potenciais reservatórios de AMR, no entanto os dados permanecem escassos. Este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência da AMR entre 2017 e 2019, em 2050 isolados de bactérias de Gram-negativo e positivo, em animais exóticos de companhia, originários de Toulouse, França. Os isolados bacterianos foram identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF. A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão por disco e o perfil fenotípico de resistência foi determinado em 483 isolados. A análise estatística foi realizada no GraphPad Prism® (versão 8.4.2.) e as diferenças foram consideradas relevantes se $p<0,05$. As taxas de AMR foram analisadas ($p<0,0001$) para avaliar o perfil de resistência nos três anos. Os isolados apresentaram resistência variável a diferentes grupos de antibióticos (β-lactâmicos, aminoglicosídeos, anfenicóis, fluoroquinolonas, fusidinas, lincosamidas, macrólidos, pleuromutilinas, polimixinas, sulfonamidas e tetraciclinas). No entanto, verificou-se uma maior frequência de resistência a β-lactâmicos, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e anfenicóis. Foram observadas múltiplas bactérias multi-resistentes (MDR) com predominância em *Enterococcus faecalis* (n = 79) e *Escherichia coli* (n = 52). Estes resultados evidenciam os animais exóticos como reservatório de bactérias MDR, constituindo um potencial risco para a saúde pública. A monitorização da resistência antimicrobiana em todas as espécies animais, em conjunto com políticas restritivas de uso de antibióticos, reforço de medidas e intervenções preliminares, são urgentemente necessárias.

Este é o primeiro relatório de monitorização em larga escala de AMR em animais exóticos de estimação facultando novos conhecimentos sobre o estado atual da resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: Animais exóticos, resistência antimicrobiana, França, *One Health*

ABSTRACT

Antimicrobials are important tools for therapy of infectious bacterial diseases in human and veterinary medicines. The overuse of antimicrobials is contributing to the rising threat of antimicrobial resistance (AMR). Currently, antimicrobial resistance is one of the most important public health issues.

Exotic species have been described as potential reservoirs of AMR, however data remain scarce. This study aimed to assess the prevalence of AMR between 2017 and 2019, among 2050 isolates of Gram-negative and positive bacteria, from exotic pets originating from Toulouse, France. Bacterial isolates were identified using MALDI-TOF mass spectrometry. Antimicrobial susceptibility testing was assayed by disk diffusion method and phenotypic resistance profiles of 483 isolates were determined. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® (version 8.4.2.) and differences were considered relevant if $p<0.05$. AMR rates were analyzed ($p<0,0001$) to evaluate the resistance profile among the three years. Isolates showed variable resistance to different antibiotics groups (β-lactams, aminoglycosides, amphenicols, fluoroquinolones, fusidane, lincosamides, macrolides, pleuromutilins, polymyxins, sulfonamides and tetracyclines). However, was more frequently the resistance to β-lactams, macrolides, tetracyclines, fluoroquinolones and amphenicols. Multiple Multidrug Resistant (MDR) bacteria were observed with predominance in *Enterococcus faecalis* (n=79) and *Escherichia coli* (n=52). These results highlight exotic pets as a reservoir of MDR bacteria, a potential hazard to public health. Monitoring antimicrobial-resistance in all animal species amongst restrictive antibiotic use policies, improvement measures and preliminary interventions are urgently required.

This is the first report of a large-scale monitoring antimicrobial resistance in exotic pets bringing new insights to the current status of antimicrobial resistance.

Keywords: Exotic pets, antimicrobial resistance, France, *One Health.*

1. INTRODUÇÃO GERAL

O termo *antibiótico* foi criado, em 1889, por Vuillemin. Mas só em 1936 é que se inicia a Era moderna da antibioterapia, com o uso da sulfanilamida (prontosil) (Brown & Wright, 2016). A História da Medicina Moderna foi fortemente marcada pela descoberta destas moléculas, ao permitir o tratamento eficaz de doenças infeciosas até então consideradas mortais (*v.g*.: tuberculose, lepra, sífilis, infecções pulmonares e meningite bacteriana) (Brown & Wright, 2016). Posteriormente, a utilização destas moléculas foi alargada à Medicina Veterinária, nomeadamente, ao ambiente de produção animal, o que contribuiu, soberanamente, para a situação atual da emergência de bactérias multi-resistentes (MDR) e pan-resistentes (PDR) a nível mundial, constituindo um grave problema de saúde pública global (Landers *et al.*, 2012).

O início da Era da antibioterapia ficou para sempre associado na História da Medicina à descoberta acidental da penicilina por *Sir* Alexander *Fleming* (1928). Em 1945, *Sir* Alexander Fleming, Florey e Chain receberam o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia (Gaynes, 2017). No momento da cerimónia *Sir A. Fleming* advertiu: "It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body" (Fleming, 1945). O surgimento das resistências antimicrobianas já era uma possibilidade invocada naquela época, o que despoletou e originou a descoberta de novas moléculas (anos 40 e 60 do séc. XX), ficando conhecido este período como "Antibiotic Golden Era", (Figuras 1 e 2) (Karmakar & Gaitonde, 2019).

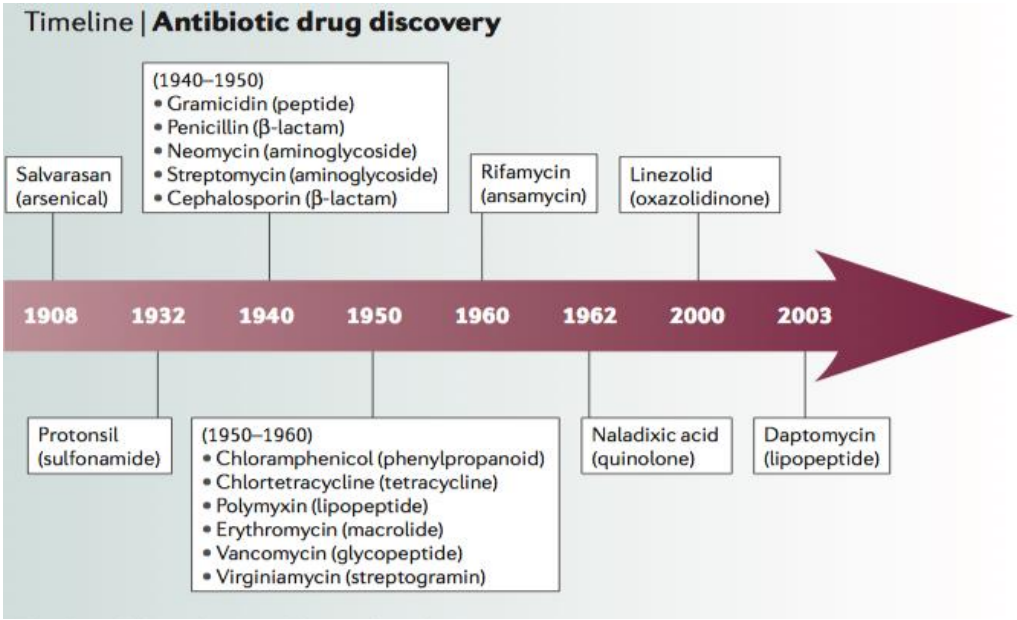

Figura 1 - Dados cronológicos sobre a descoberta de antimicrobianos (Wright, 2007).

A utilização massiva destes compostos nas Medicinas Humana e Veterinária em muito se deveu ao conceito de que os antibióticos solucionavam todas as doenças infeciosas. Contudo rapidamente se observou o surgimento das primeiras resistências bacterianas, que se foram disseminando exponencialmente até aos nossos dias, comprometendo a eficácia terapêutica destes compostos e, consequentemente, traduzindo-se num aumento das taxas de mortalidade e morbilidade a nível mundial (Zhang *et al.*, 2016). Esta situação encontra-se relacionada com a plasticidade das populações bacterianas em se adaptarem à ação do homem, nomeadamente à exposição a concentrações subinibitórias de antibióticos, sendo o fenómeno da resistência bacteriana classificado como natural (D`costa *et al.*, 2011; Perry *et al.*, 2016).

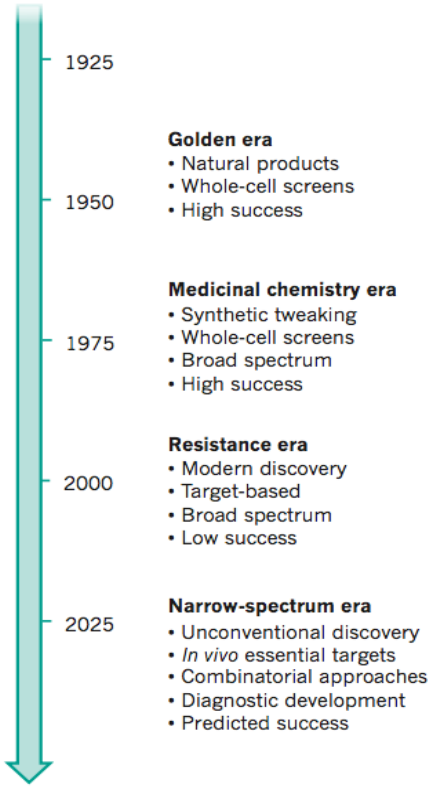

Figura 2 - Cronologia da descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos *versus* resistências e novas abordagens de diagnóstico e terapêutica do séc. XX ao séc. XXI (Brown & Wrigth, 2016).

De facto, tem sido reportado em alguns estudos, através de análise genómica de sedimentos de *permafrost* do Ártico e Antártico, que genes de resistência a antibióticos, que conferem resistência às classes dos β-lactâmicos, tetraciclinas e glicopéptidos podem ter tido uma origem cronológica muito superior a 5, 000 anos, sendo de ressalvar que a própria Transferência Horizontal de Genes (THG) através de plasmídeos e transposões conjugativos também já ocorria (D`costa *et al*., 2011; Perron *et al.*, 2015; Petrova *et al.*, 2014).

Outro estudo, analisando o microbioma intestinal de uma múmia Andina pré-Colombiana, Perú (980-1170 d.C.), detetou vários genes de resistência a diferentes classes de antibióticos (Santiago-Rodriguez *et al.*, 2015), o que é justificado com o facto de muitos dos antibióticos utilizados atualmente na terapêutica, terem tido origem em biomoléculas ou metabolitos secundários produzidos por micro-organismos presentes nos solos (D'Costa *et al*., 2011; Perry *et al*., 2016).

Com o avanço das novas tecnologias, particularmente da metagenómica, foi permitida a caracterização e análise do resistoma, demonstrando que a dispersão e disseminação destes genes ocorria entre diferentes e distantes nichos ambientais, incluindo os que antecederam a era pré-antibiótica (Davies & Davies, 2010). Este fenómeno de disseminação tem demonstrado consistência com o rápido

aparecimento de resistências aos antibióticos na prática clínica, pois através da pressão seletiva devido ao uso excessivo e incorreto dos antibióticos, forçou-se a mobilização e expressão de genes pré-existentes codificadores de elementos de resistência nas populações bacterianas (Brown & Wright, 2016). Esta pressão seletiva exercida sobre as bactérias, levou à evolução e expressão de organismos cada vez mais resistentes e/ou completamente resistentes, tais como as bactérias MDR e PDR (Quinn *et al.*, 2016). Neste contexto, alguns autores têm defendido a resistência adquirida como uma resposta adaptativa natural (Munita & Arias, 2016).

Os Antibióticos, são moléculas que apresentam toxicidade seletiva para as células procariotas, não tendo como objetivo influenciar qualquer atividade biológica do organismo humano, ou animal, mas sim impedir o crescimento ou mesmo provocar a morte das bactérias através da indução de alterações nos processos de crescimento e divisão celular (bacteriostáticos) ou destruição completa da célula (bactericidas) (Sousa *et al.*, 2016). Encontram-se classificados por famílias/classes consoante o seu mecanismo de ação sobre a célula bacteriana, atuando em locais alvo específicos inexistentes nas células eucariotas: anti-parietais, anti-membranares, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese dos ácidos nucleicos, antimetabolitos e nitrofuranos (Figura 3) (Kapoor *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2016).

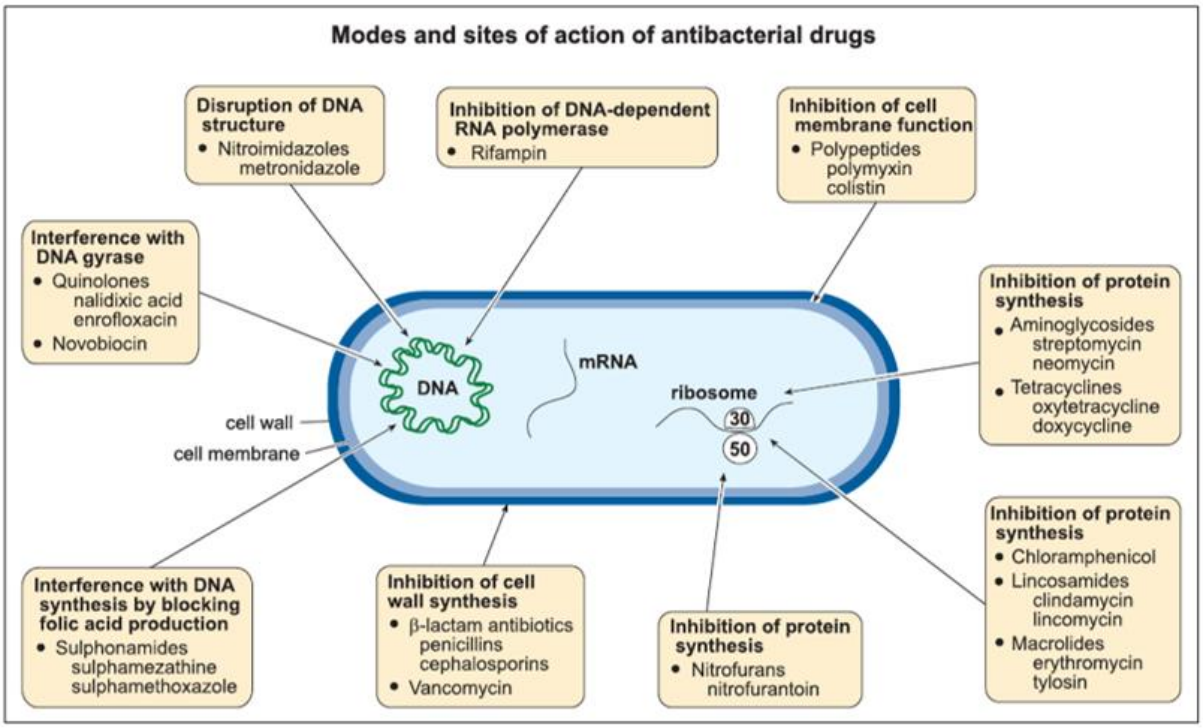

Figura 3 - Mecanismo de ação de diferentes classes de antibióticos no alvo celular bacteriano (Quinn *et al.*, 2016).

Contudo, a resistência bacteriana levou ao comprometimento da eficácia destes compostos (Wright, 2007), podendo ser classificada como natural/intrínseca, ou como adquirida/extrínseca, esta última tem contribuído para a rápida disseminação da resistência bacteriana (Quinn *et al.*, 2016). Por sua vez, os mecanismos de resistência bacterianos podem ser mediados por bombas de efluxo, impermeabilização da membrana externa, alteração do local alvo e/ou expressão de enzimas que inativam quimicamente os antibióticos (Blair *et al.*, 2015).

Um dos mecanismos de resistência mais comuns é a inativação enzimática através da ação de β-lactamases, que hidrolisam e inibem a ação dos antibióticos β-lactâmicos através da cisão do anel β-lactâmico. Segundo a classificação de Ambler, a classe A destas enzimas é mais comum entre bactérias de Gram-negativo, sendo a maioria disseminada através de plasmídeos conjugativos, enquanto que a classe C inclui enzimas codificadas cromossomalmente. Ambas as classes são similares quanto ao resíduo de serina no seu centro ativo, porém as β-lactamases da classe B diferem das anteriores por serem metaloenzimas ao dependerem do co-factor zinco, sendo responsáveis pela hidrólise dos carbapenemos (Nikaido, 2009; Santajit & Indrawattana, 2016; Blair *et al*., 2015).

De facto, nas últimas décadas observou-se um aumento de estirpes resistentes a várias classes de antibióticos na família *Enterobacteriaceae*, portadoras de β-lactamases de espectro alargado (ESBL), cefalosporinases, e/ou carbapenemases (Dolejska & Papagiannitsis, 2018). Consequentemente, observou-se a reintrodução da colistina (Polimixina E) para combater infeções provocadas por algumas bactérias de Gram-negativo MDR, contudo, recentemente, foram identificados plasmídeos portadores de genes que codificam a resistência à colistina (*mcr*-1/*mcr*-2) (Costa & Silva, 2018; Liu *et al.*, 2016; CA-SFM, 2013).

São descritas outras enzimas para além das β-lactamases ou ESBL com capacidades de inativação das moléculas de antibióticos através de mecanismos de fosforilação (fosfotransferases), acetilação (acetiltransferases) e adenilação (adeniltransferases) que inibem a ação de antibióticos como os aminoglicosídeos, anfenicóis e quinolonas (Nikaido, 2009).

Outra estratégia passa por impedir a ligação do antibiótico à célula bacteriana através da modificação do local alvo de ligação, como a alteração de PBP's (Penicilin-Binding-Proteins). Nas estirpes MRSA (Meticillin Resistant *Staphylococccus aureus*) a PBP2a (codificada pelo gene *mecA)* possui uma baixa afinidade para todos os β-lactâmicos (Santajit & Indrawattana, 2016). Também se encontra descrita a proteção do local alvo através de metilação do RNA ribossómico 16S (codificada pelos genes *erm*), que conferem resistências a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas, ou os genes *cfr*, que conferem resistências aos anfenicóis, lincosamidas, estreptograminas e oxazolidononas. É de referir que ambos os genes *cfr* e *erm* são transferidos através de plasmídeos conjugativos, encontrando-se descritos em bactérias de Gram-negativo (*v.g.: E.coli)* e de Gram-positivo (*v.g.: S.aureus, Enterococcus* spp.). Outros genes como os *qnr*, codificam a resistência às quinolonas (Blair *et al*., 2015; Nikaido, 2009).

Com o objetivo principal de diminuir a concentração intracelular de antibióticos, algumas bactérias são portadoras de bombas de efluxo. Algumas expulsam um espectro de antibióticos específico como sejam as tetraciclinas (codificada por alguns genes *tet*), enquanto que outras são expressas pela presença de diferentes antibióticos (Figura 4) (Blair *et al.*, 2015).

As bombas de efluxo encontram-se classificadas em cinco superfamílias: ABC (*ATP-Binding Cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), RND (*Resistance-Nodulation-Divison*), SMR (*Small Multidrug Resistance*), MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*) (Figura 4), podendo também ser transferidas entre bactérias através de Elementos Genéticos Móveis (EGM) (Blanco *et al.*, 2016; Santajit & Indrawattana, 2016; Nikaido, 2009).

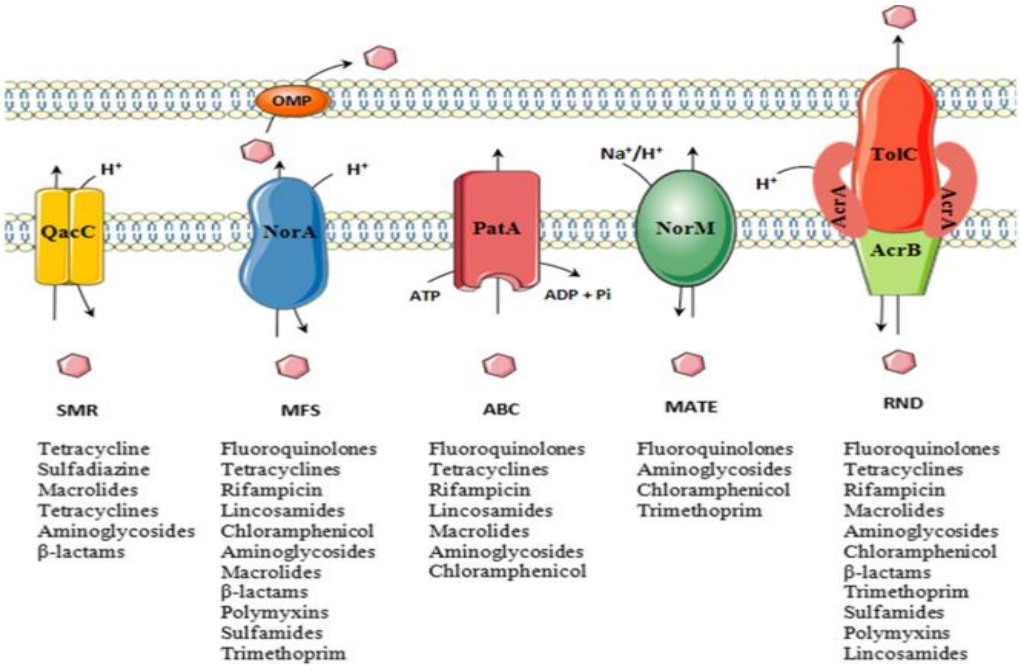

Figura 4 - Diagrama comparativo entre as cinco famílias de Bombas de Efluxo (Yilmaz & Özcengiz, 2016).

Por último, é de referir a impermeabilização da membrana externa nas bactérias de Gram-negativo. Estas possuem porinas, que formam canais de comunicação entre o meio extra e intracelular. A ocorrência de mutações nas porinas leva à perda de permeabilidade da membrana externa, impedindo assim a entrada de antibióticos (Nikaido, 2009). Dados recentes, demonstraram que algumas estirpes dos géneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, apresentavam elevadas taxas de resistência aos carbapenemos e cefalosporinas, mediada por este mecanismo (Blair *et al.*, 2015).

A disseminação de resistências à escala global, encontra-se diretamente relacionada com o uso abusivo de antibióticos, seja em ambiente de profilaxia ou terapêutica, quer nas medicinas humana ou animal, contribuindo para a seleção de estirpes MDR (Levy & Bonnie, 2004). Por outro lado a plasticidade genómica de algumas bactérias permite a transferência ou captação de genes de resistência, através de mecanismos como a conjugação, transdução e/ou transformação (Levy &

Bonnie, 2004; Partridge *et al.*, 2018), que favorecem a aquisição e Transferência Horizontal de Genes (THG) transportados por EGM, entre diferentes grupos taxonómicos, levando à disseminação e circulação dessas estirpes por diferentes ambientes (Butaye *et al.*, 2014; Levy & Bonnie, 2004).

A problemática da disseminação de estirpes MDR e PDR é atualmente uma das maiores preocupações a nível mundial e um dos maiores desafios do Sec. XXI, tendo levado a *World Health Organization* (WHO) (2015) a publicar um plano global de combate à resistência aos antimicrobianos no contexto de *One Health*, reforçado pelas *United Nations* (2016) e adoptado pela *World Animal Health Organisation* (OIE) e *Food and Agriculture Organization* (FAO) (EU, 2015). Neste contexto os líderes mundiais comprometeram-se em unir esforços para o controlo das resistências bacterianas quer nas medicinas humana, quer animal através da adoção de uma política de *One Health*, onde é reconhecido que a saúde humana está conectada à saúde animal e ambiental, devendo ser incentivada a estreita colaboração entre as diferentes áreas para a prevenção e capacitação da resposta a esta ameaça emergente (WHO, 2017). Ainda de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), nos últimos 20 anos apenas foram aprovadas e autorizadas duas novas classes de antibióticos, ambas dirigidas a agentes etiológicos de Gram-positivo, comprometendo o combate de infeções provocadas por bactérias de Gram-negativo. Assim a WHO publicou uma lista de agentes patogénicos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento urgentes de novas moléculas de antibióticos eficazes contra estas estirpes (Figura 5) (WHO, 2017).

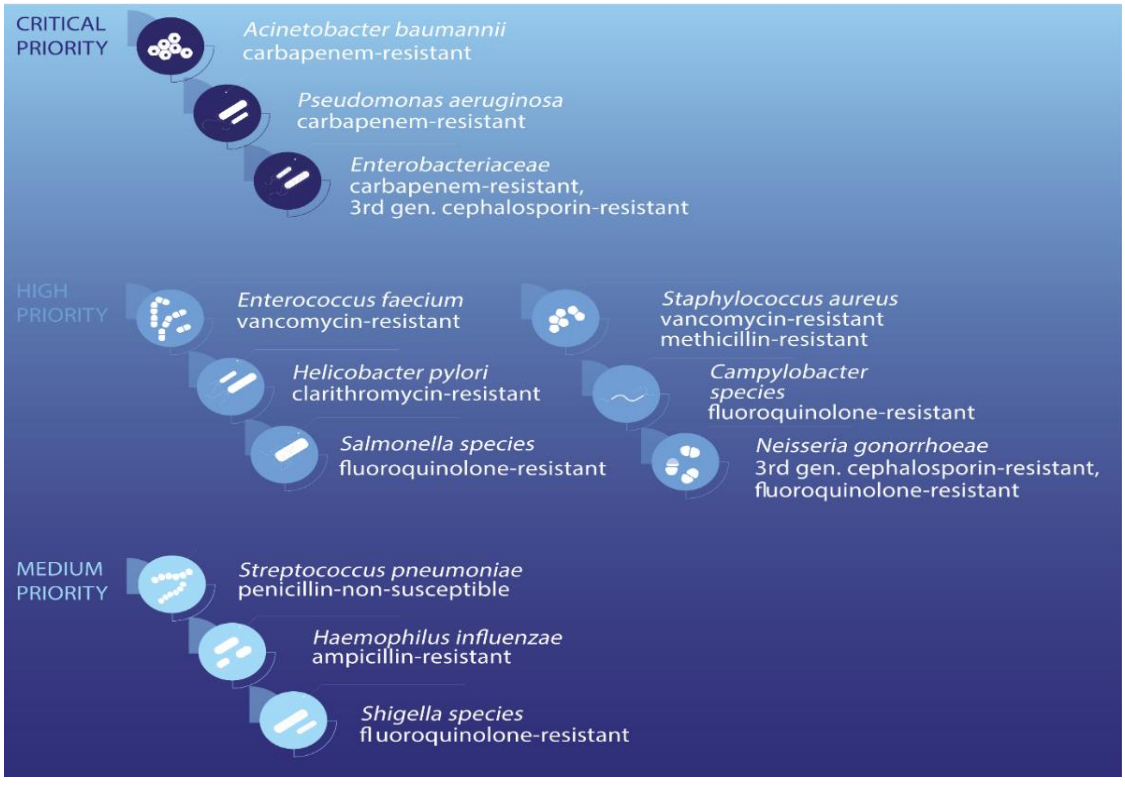

Figura 5 - Lista das bactérias prioritárias para pesquisa de novos antibióticos (WHO, 2017).

2. OBJETIVO

Este estudo propõe a análise da prevalência do perfil fenotípico de suscetibilidade a diferentes classes de antibióticos em animais exóticos num período de tempo decorrido entre 2017 e 2019 na região de Toulouse, França.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para o presente estudo, de carácter retrospetivo, foram analisados os boletins analíticos referentes aos resultados de identificação dos agentes etiológicos de infeções bacterianas em animais exóticos (Tabela suplementar 1) e Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA), que foram realizados em produtos biológicos de pacientes (Tabela suplementar 2), que procuraram acompanhamento clínico na Clinique des NAC, situada em Toulouse-França. Os dados dizem respeito aos anos civis de 2017, 2018 e 2019.

A base de dados fornecida pela clínica comportou um total de 2050 isolados (1086 isolados de bactérias de Gram-negativo e 964 de Gram-positivo) (Tabelas 1 e 2). Devido a vasta diversidade de espécies animais, estas foram organizadas em grupos de pequenos mamíferos, répteis e aves (Gráfico 1), incluindo machos e fêmeas, sem restrições de idades nem de historial clínico.

Tabela 1- Dimensão da amostra de bactérias de Gram-negativo isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves.

Bactérias de Gram-negativo	**Ano 2017 (n=)**	**Ano 2018 (n=)**	**Ano 2019 (n=)**
Enterobacteriaceae	188	271	175
Citrobacter spp.	12	6	5
Escherichia coli	43	72	40
Enterobacter spp.	39	56	36
Erwinia pyrifolia	-	-	1
Klebsiella spp.	34	49	28
Morganella spp.	3	8	3
Pantoea spp.	10	14	6
Proteus spp.	20	29	16
Providencia rettgeri	4	7	4
Rahnella spp.	2	1	1
Raoultella spp.	7	2	1
Salmonella spp.	2	1	3
Serratia spp.	12	25	29
Tatumella ptyseos	-	-	1
Yersinia pseudotuberculosis	-	1	1
Pseudomonadaceae	58	77	41
Pseudomonas aeruginosa	38	58	31
Pseudomonas spp.	20	19	10
Pasteurellaceae	84	109	83
Actinobacillus spp.	-	3	3
Chelonobacter oris	-	2	-
Haemophilus spp.	3	12	11
Mannheimia spp.	4	4	8
Pasteurella spp.	77	88	61

n= dimensão da amostra

Tabela 2- Dimensão da amostra de bactérias de Gram-positivo isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves.

Bactérias de Gram-positivo	Ano 2017 (n=)	Ano 2018 (n=)	Ano 2019 (n=)
Staphylococcaceae	193	198	122
Gemella spp.	19	11	8
Macrococcus caseolyticus	-	-	1
Staphylococcus aureus	44	52	26
Staphylococcus epidermidis	18	20	9
Staphylococcus xylosus	42	87	14
Staphylococcus spp.	70	78	64
Streptococcaceae	87	103	69
Lactococcus spp.	3	7	-
Streptococcus spp.	84	96	69
Enterococcaceae	62	89	41
Enterococcus faecalis	40	58	27
Enterococcus spp.	22	22	14
Vagonococcus fluvialis	-	3	-

n= dimensão da amostra

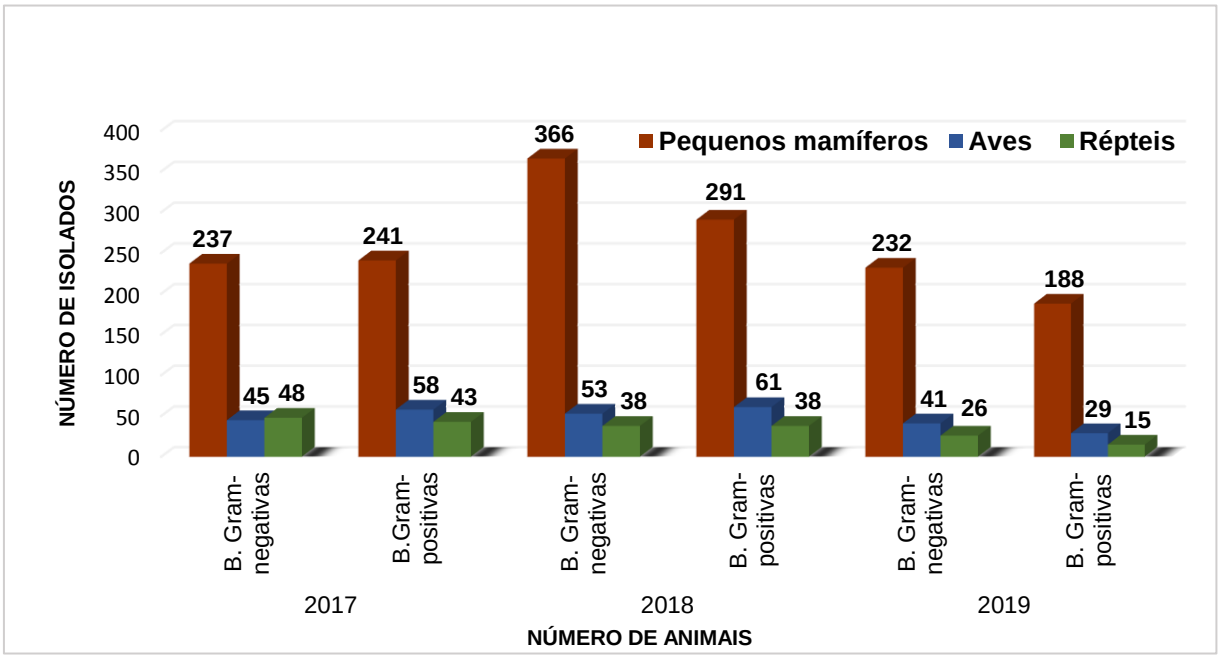

Gráfico 1 - Caracterização da amostra consoante os grupos de bactérias e de animais.

3.2. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS E ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A identificação dos agentes etiológicos realizou-se através de espectrometria de massa por Maldi-ToF no laboratório de biologia médica humana BIOLAB Avenir em Toulouse, França. Os TSA foram realizados pelo método de difusão por disco de acordo com as normas estandardizadas pelo Comité de l'Antibiogramme da Société Française de Microbiologie (CA-SFM) em conjunto com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), respeitando a Norma AFNOR NF U47-107 (TSA em saúde animal). Os meios de cultura utilizados foram adquiridos à BIOMÉRIEUX® e os discos de antibiótico à MAST-DIAGNOSTIC®, Toulouse, França (Tabela 3). Após pré-selecção de isolados dos anos de 2017/18/19, que incluiu diferentes famílias, géneros e/ou espécies, procedeu-se à leitura, análise e classificação dos TSA seguindo as normas veterinárias (CA-SFMVET, 2018, 2019), sendo que quando necessário, por falta de informação, recorreu-se à norma utilizada na medicina humana (CA-SFM, 2013). A conformidade do sistema de gestão da qualidade do laboratório e acreditação dos resultados foi cumprida ao abrigo da Norma NP EN ISO/IEC 17025.

Em virtude da falta de representatividade da amostragem para realizar a análise de alguns TSA, utilizou-se uma linha de corte, que excluiu os géneros/espécies, que apresentavam um número de isolados inferior a 20 e todos os antibióticos que foram testados num número de isolados inferior a 10. Contudo para a análise e contabilização de isolados MDR foi considerado o número total de isolados presentes na amostra inicial (n= 2050).

Tabela 3 - Antibióticos utilizados para o estudo da suscetibilidade e respetiva concentração.

Princípio ativo	Concentração
Ácido fusídico	10 ug
Amoxicilina + ácido clavulânico	20 + 10 ug
Penicilina G	6 ug
Cefalexina	30 ug
Ceftiofur	30 ug
Azitromicina	15 ug
Tilosina	30 ug
Gentamicina	15 ug
Neomicina	30 ug
Tobramicina	10 ug
Framicetina	30 ug
Tetraciclina	30 ug
Doxiciclina	30 ug
Colistina	50 ug
Enrofloxacina	5 ug
Marbofloxacina	5 ug
Cloranfenicol	30 ug
Florfenicol	30 ug
Sulfonamida-Trimetoprim	25 ug
Tiamulina	30 ug
Clindamicina	2 ug
Lincomicina	15 ug

ug= microgramas

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Banco de dados foi organizado em Programa Excel® (Microsoft Office 365 ProPlus) e analisado com recurso a tabelas dinâmicas. O perfil de suscetibilidade a antibióticos foi analisado, aplicando o teste Chi-square (p<0,05), recorrendo ao software GraphPad Prism®, version 8.4.2.

4. RESULTADOS

No presente estudo, foram atribuídas duas classificações para o tipo de suscetibilidade bacteriana apresentada: suscetível (S) e resistente (R), sendo de referir que os isolados com classificação de perfil de suscetibilidade intermédia foram incluídos no grupo de isolados com perfil de resistência.

4.1. BACTÉRIAS DE GRAM-NEGATIVO

Com base nos resultados obtidos, ao longo do triénio, foi possível observar em *Enterobacteriaceae* uma elevada % de isolados R à classe das tetraciclinas, particularmente, à DOX (*E. coli*: 94/92/97%; *Enterobacter* spp.: 91/94/100%; *Klebsiella* spp.: 89/92/89%; *Serratia* spp.: 100/95%) (Gráficos 2, 3, 4 e 6; Tabela suplementar 3), contrariamente *Pasteurella* spp. apresentou um declínio acentuado da % de isolados R no biénio de 2017/18 (43 e 13%, respectivamente) (Gráfico 8; Tabela suplementar 3). Relativamente ao perfil de suceptibilidade de *E. coli* ao CHL observou-se, no biénio de 2017/18, um aumento da % de isolados R, quanto às fluoroquinolonas verificou-se também um aumento da % de isolados R de *E. coli* (ENR: 26/21/28%; MRB: 20/18/26%) e *Serratia* spp. (ENR: 4/11 %; MRB: 0/4%; biénio de 2018/19) (Gráficos 2 e 6; Tabela suplementar 3).

Na classe dos β-lactâmicos *Enterobacteriacea* e *Pseudomonadaceae* apresentaram uma elevada % de isolados R (AMC - *E. coli*: 90/91/95%; *Klebsiella* spp.: 100%; CFT - *Enterobacter* spp.: 80%; *P. aeruginosa*: 90/100/100%) (Gráficos 2, 3, 4 e 7; Tabela suplementar 3).

É ainda de referir que no biénio de 2017/18 *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. apresentaram um aumento de isolados R ao SXT (30/41%; 33/43%, respetivamente) (Gráficos 4 e 5; Tabela suplementar 3).

Contudo, em algumas classes de antibióticos observou-se uma evolução positiva na diminuição da % de isolados R: aminoglicosídeos (GEN - *E. coli*: 58/42/40%; *Enterobacter* spp.: 75/55/50%; *Klebsiella* spp.: 81/43/40%; *Proteus* spp.: 38/7%; *P. aeruginosa*: 33/28/10%; *Pasteurella* spp.: 33/15/11%) e fluoroquinolonas (MRB - *Enterobacter* spp.: 31/20/6%; *Klebsiella* spp.: 26/34/15%; *Proteus* spp.: 20/7%; ENR – *Enterobacter* spp.: 47/31/33%; *Klebsiella* spp.: 55/57/30%; *Proteus* spp.: 25/18%) (Gráficos 2 – 8; Tabela suplementar 3).

Pasteurella spp. ao longo do triénio apresentou uma evolução positiva no seu perfil de suscetibilidade à maioria das classes de antibióticos testadas (Gráfico 8; Tabela suplementar 3).

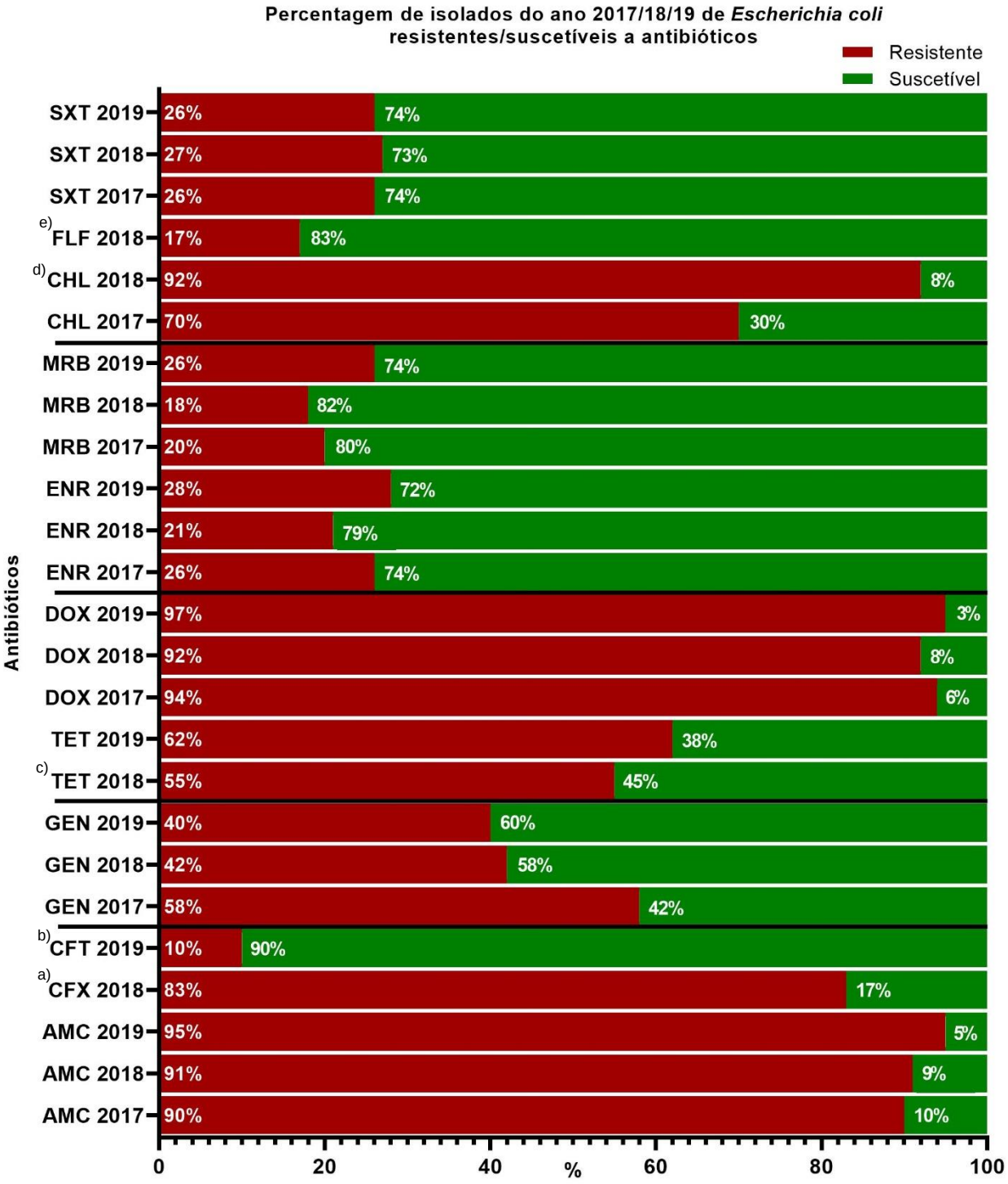

Gráfico 2 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Escherichia coli* no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; CFX, cefalexina; CFT, ceftiofur; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; FLF, florfenicol ; SXT, sulfonamida-trimetoprim.
[a)]CFX/ [e)]FLF- não foram reportados dados para os anos de 2017 e 2019; [b)]CFT- não foram reportados dados para os anos 2017 e 2018; [c)]TET- não foram reportados dados para o ano de 2017; [d)]CHL- não foram reportados dados para o ano 2019.

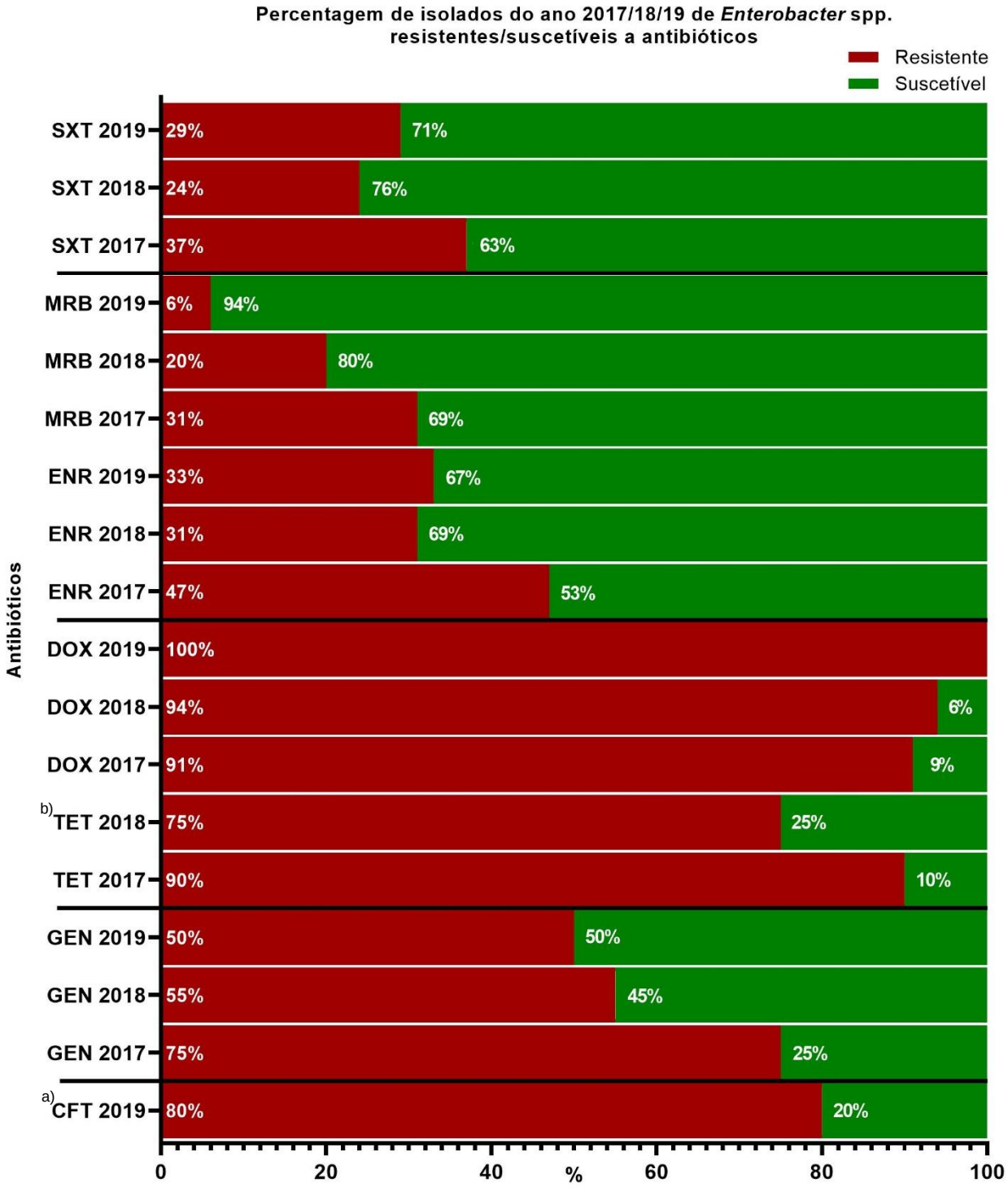

Gráfico 3 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterobacter* spp. no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). CFT, ceftiofur; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; SXT, sulfonamida-Trimetoprim.
[a)]CFT- não foram reportados dados para os anos de 2017 e 2018; [b)]TET- não foram reportados dados para o ano 2019.

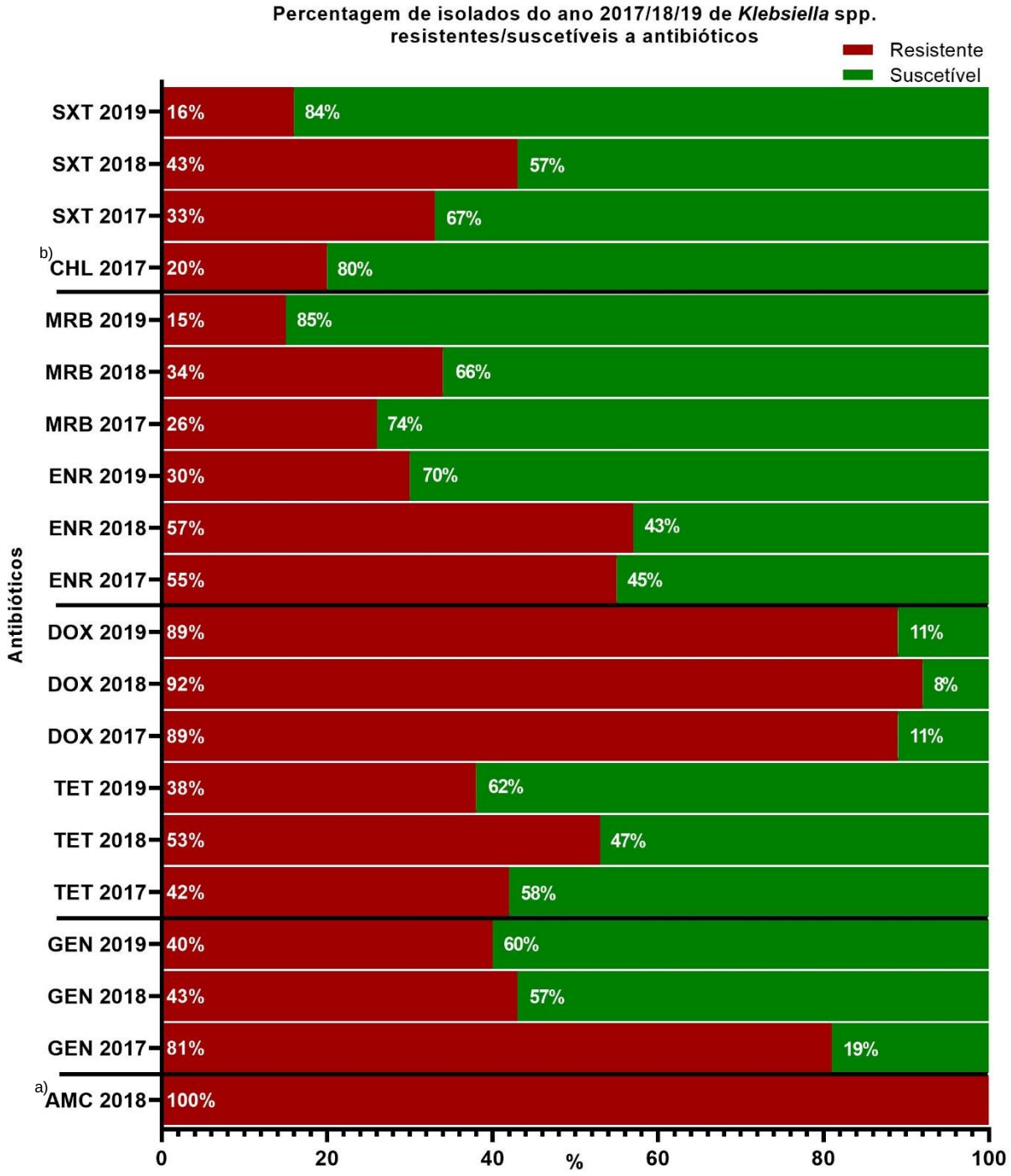

Gráfico 4 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Klebsiella* spp. no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; SXT, sulfonamida-trimetoprim.

[a)]AMC- não foram reportados dados para os anos de 2017 e 2019; [b)]CHL- não foram reportados dados para os anos 2018 e 2019.

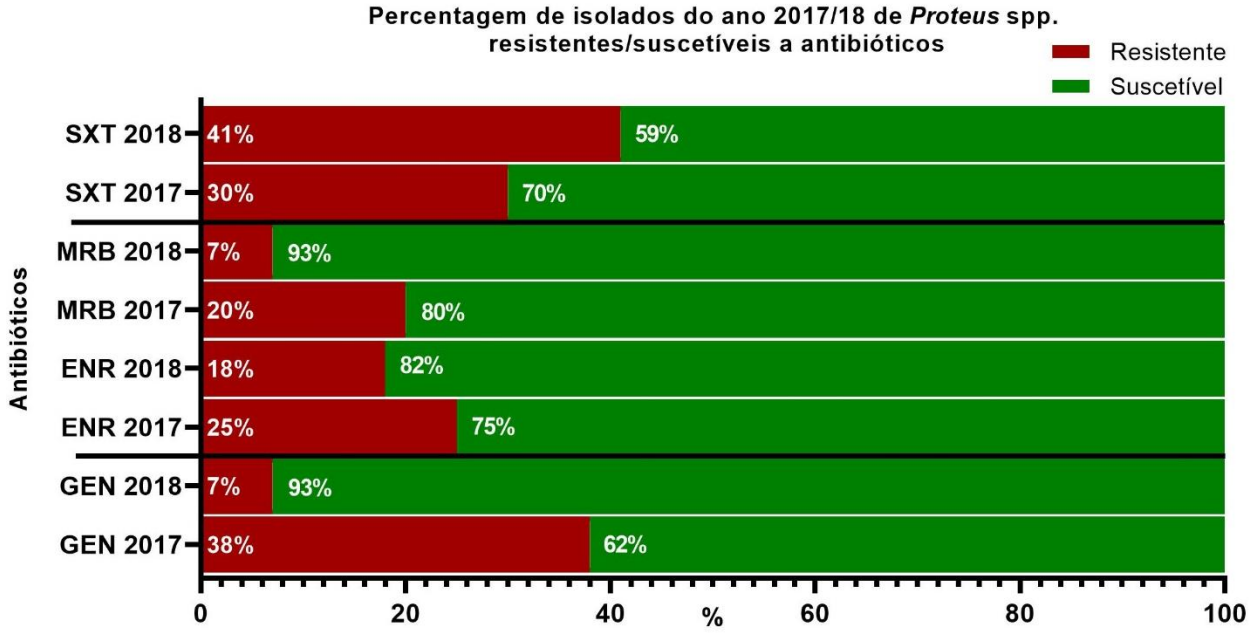

Gráfico 5 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Proteus* spp. nos anos de 2017 e 2018. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). GEN, gentamicina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; SXT, sulfonamida-trimetoprim.

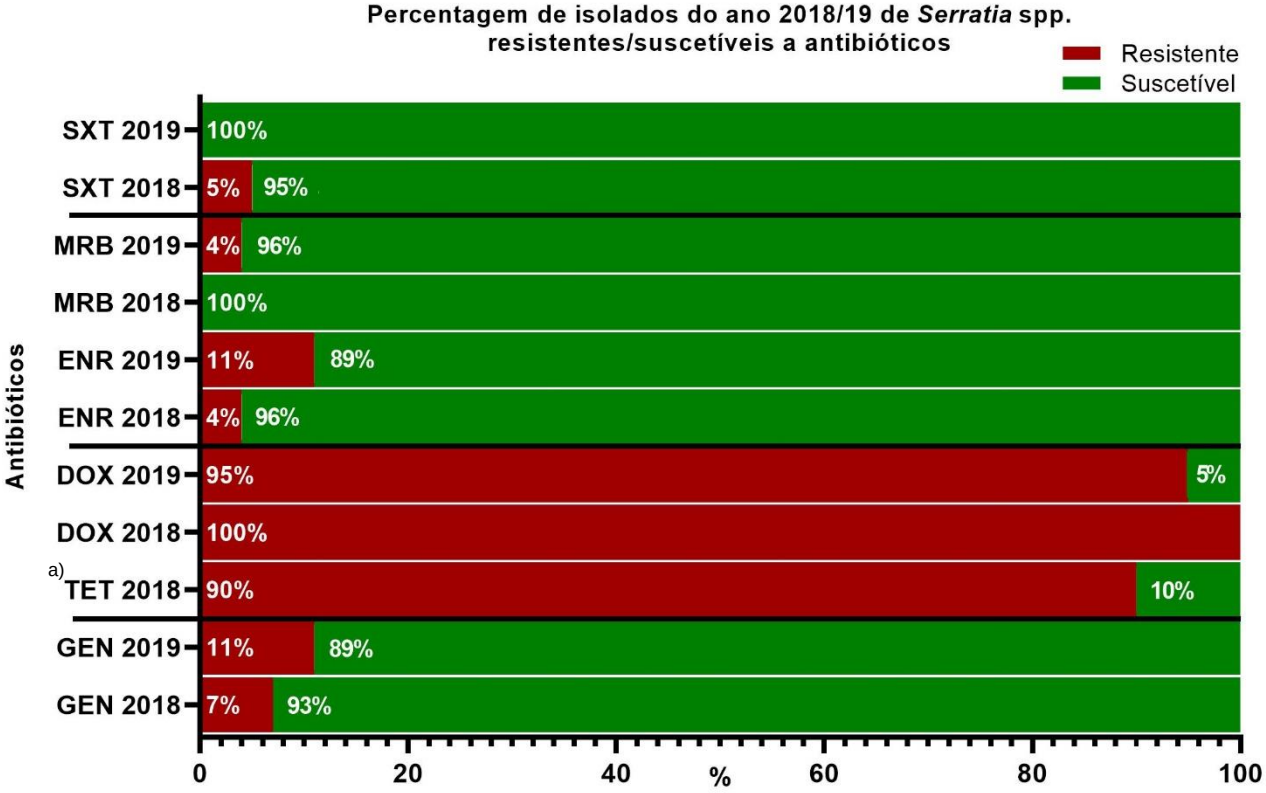

Gráfico 6 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Serratia* spp. nos anos de 2018 e 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; SXT, sulfonamida-trimetoprim.
[a)]TET- não foram reportados dados para o ano 2019.

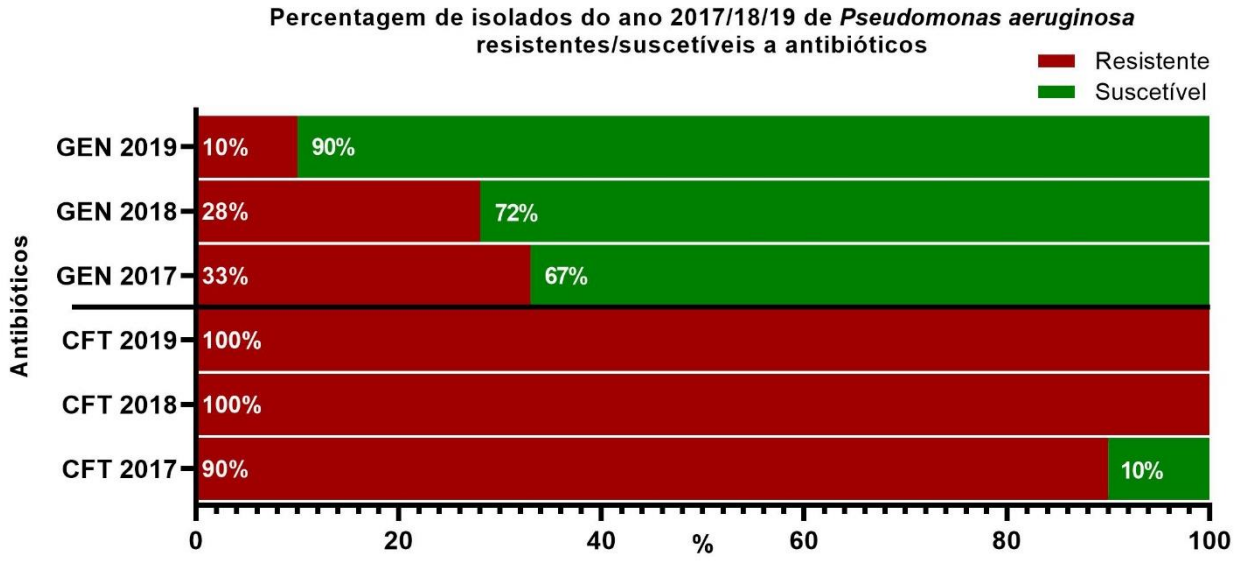

Gráfico 7 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). CFT, ceftiofur; GEN, gentamicina.

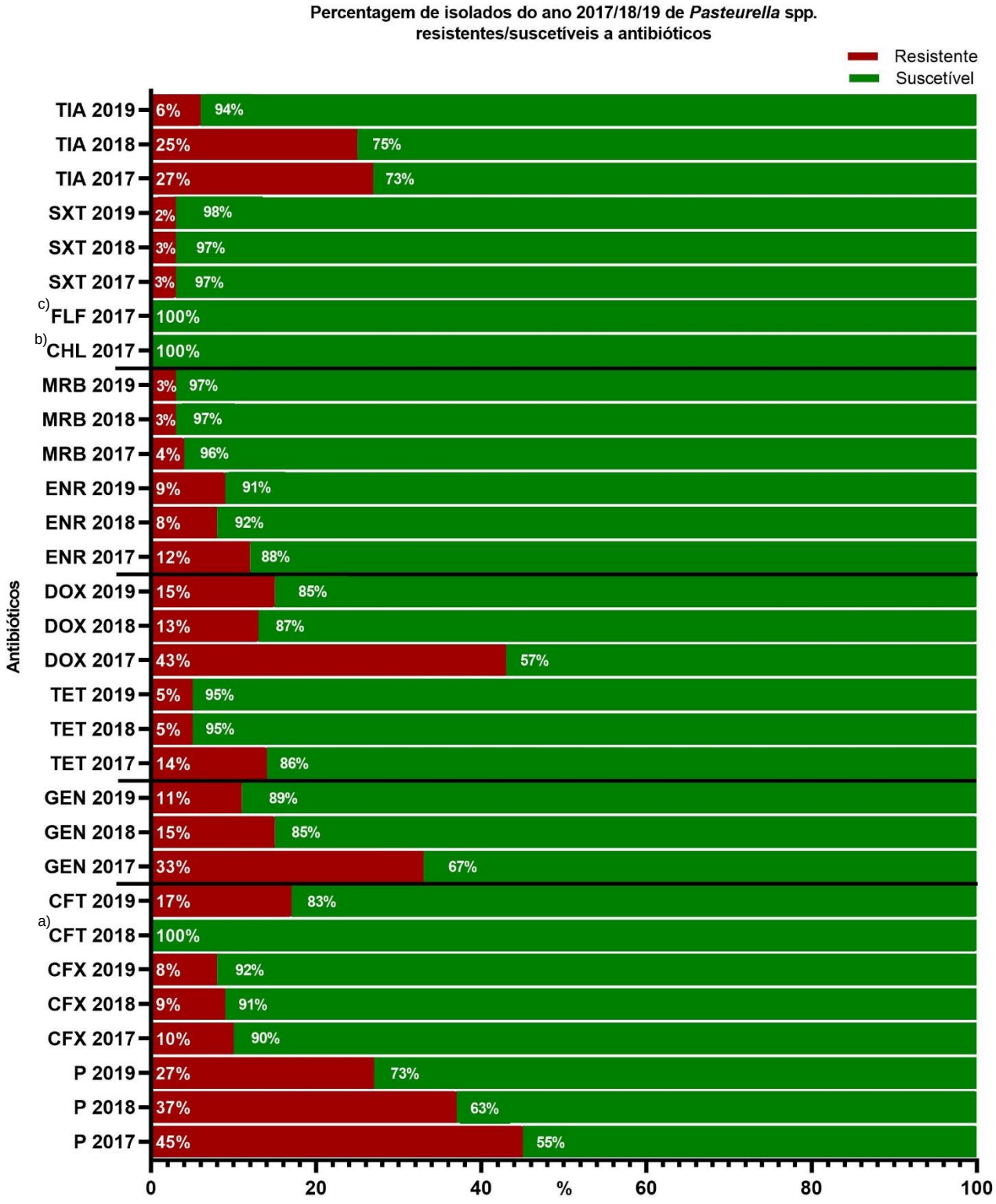

Gráfico 8 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Pasteurella* spp. no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). P, penicilina; CFX, cefalexina; CFT, ceftiofur; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; FLF, florfenicol ; SXT, sulfonamida-trimetoprim; TIA, Tiamulina.

[a)]CFT-não foram reportados dados para o ano 2017; [b)]CHL/ [c)]FLF- não foram reportados dados para os anos 2018 e 2019.

4.2. BACTÉRIAS DE GRAM-POSITIVO

Na família *Staphylococcaceae* observou-se um perfil crescente de R à classe dos β-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. no triénio em estudo (P: 57/43/55%; AMC: 13/13/38%; CFX: 19/8/25%; CFT: 9/23%, 2018/19) e tetraciclinas (TET: 24/26/40%) (Gráfico 12, Tabela suplementar 4), o mesmo se verificou nesta última classe em *S. epidermidis* (DOX: 50/59%, 2017/18) (Gráfico 10; Tabela suplementar 4).

Staphylococcaceae, *Streptococcaceae* e *Enterococcaceae* apresentaram um aumento da % de isolados R aos macrólidos (AZM - *S. aureus*: 59/72/87%; *S. epidermidis*: 53/82%; *S. xylosus*: 81/86%; *Satphylococcus* spp.: 51/64/71%; *Streptococcus* spp.: 38/52/63%; *Enterococcus faecalis*: 96/100/100%; *Enterococcus* spp.: 67/80%, 2017/18) (Gráficos 9 – 15; Tabela suplementar 4).

A evolução do perfil de suscetibilidade em *Staphylococaceae* às restantes classes de antibióticos foi positiva, observando-se um aumento da % de isolados S (Gráficos 9 – 12; Tabela suplementar 4).

Streptococcus spp., ao longo do triénio em estudo apresentou um perfil crescente da % de isolados R às lincosamidas (CLD: 21/38%, 2017/18) assim como aos macrólidos, já referido anteriormente. Observou-se ainda uma evolução positiva da % de isolados S aos β-lactâmicos, tetraciclinas e fluoroquinolonas (MRB: 58/48/41%) (Gráfico 13; Tabela suplementar 4).

Ao longo do triénio em estudo verificou-se uma % crescente de isolados R às classes dos β-lactâmicos (AMC - *E. faecalis*: 33/14/42%; Enterococcus spp.: 15/26%, 2017/18) e fluoroquinolonas (ENR - *E. faecalis*: 92/98/100%; *Enterococcus* spp.: 85/80%, 2017/18), sendo de referir o ligeiro aumento da % de isolados S à MRB (*E. faecalis*: 90/96/85%; *Enterococcus* spp.: 81/74%, biénios 2018/19 e 2017/18, respetivamente) (Gráficos 14 e 15; Tabela suplementar 4). Foi de notar que a totalidade de isolados de *E. faecalis* testados à AZM (2018/2019), ENR (2019) e CHL (2017) apresentaram perfil de R (Gráfico 14; Tabela suplementar 4), assim como *S.aureus* ao CHL em 2017 (Gráfico 9; Tabela suplementar 4).

Relativamente à classe das tetraciclinas observou-se uma diminuição acentuada da % de isolados R (TET - *E. faecalis*: 79/60/55%; DOX - *E. faecalis*: 82/78/71%; *Enterococcus* spp.: 80/33%, 2017/18) (Gráficos 14 e 15; Tabela suplementar 4).

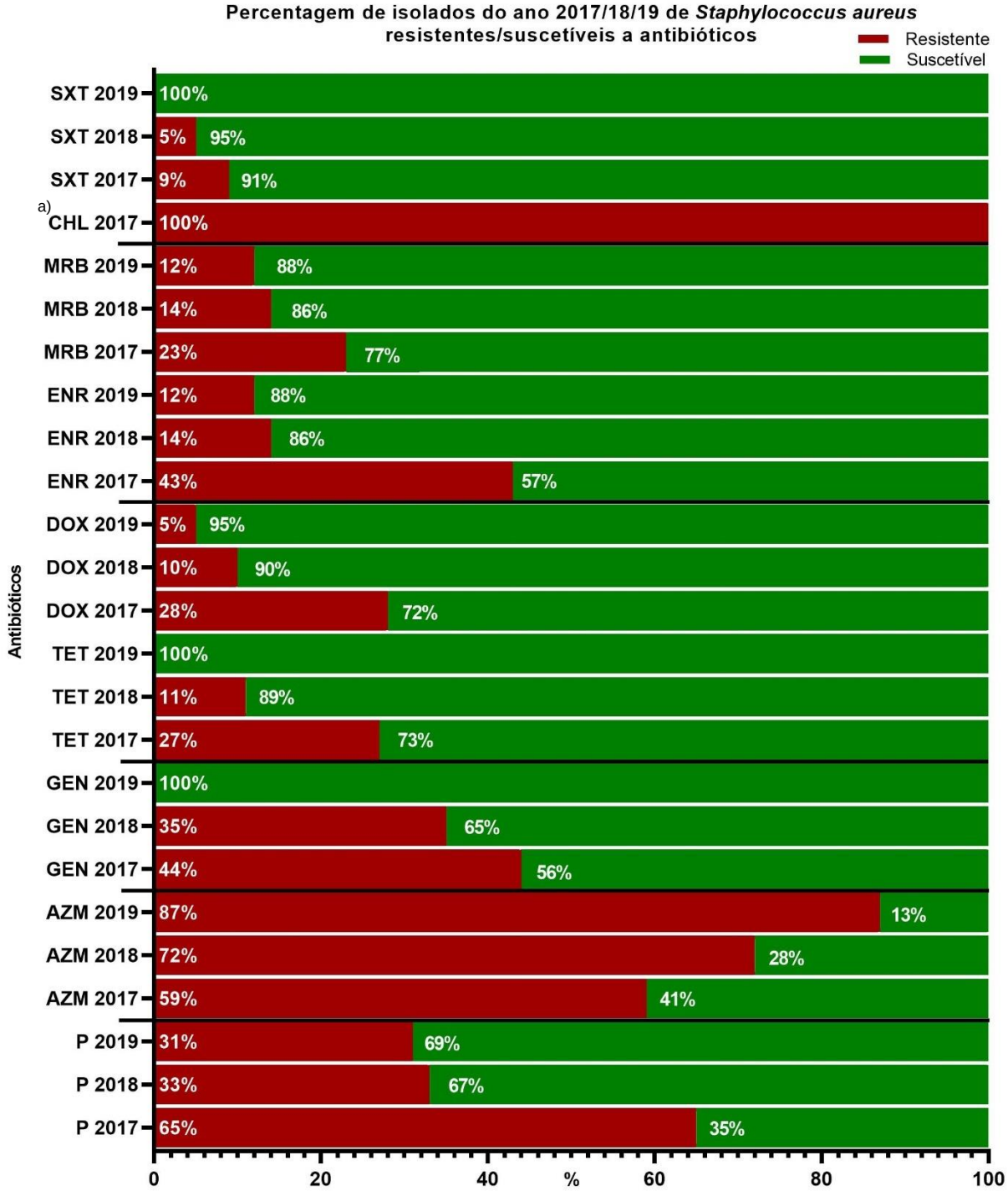

Gráfico 9 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus aureus* no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). P, penicilina; AZM, azitromicina; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; SXT, sulfonamida-trimetoprim

[a)]CHL- não foram reportados dados para os anos de 2018 e 2019.

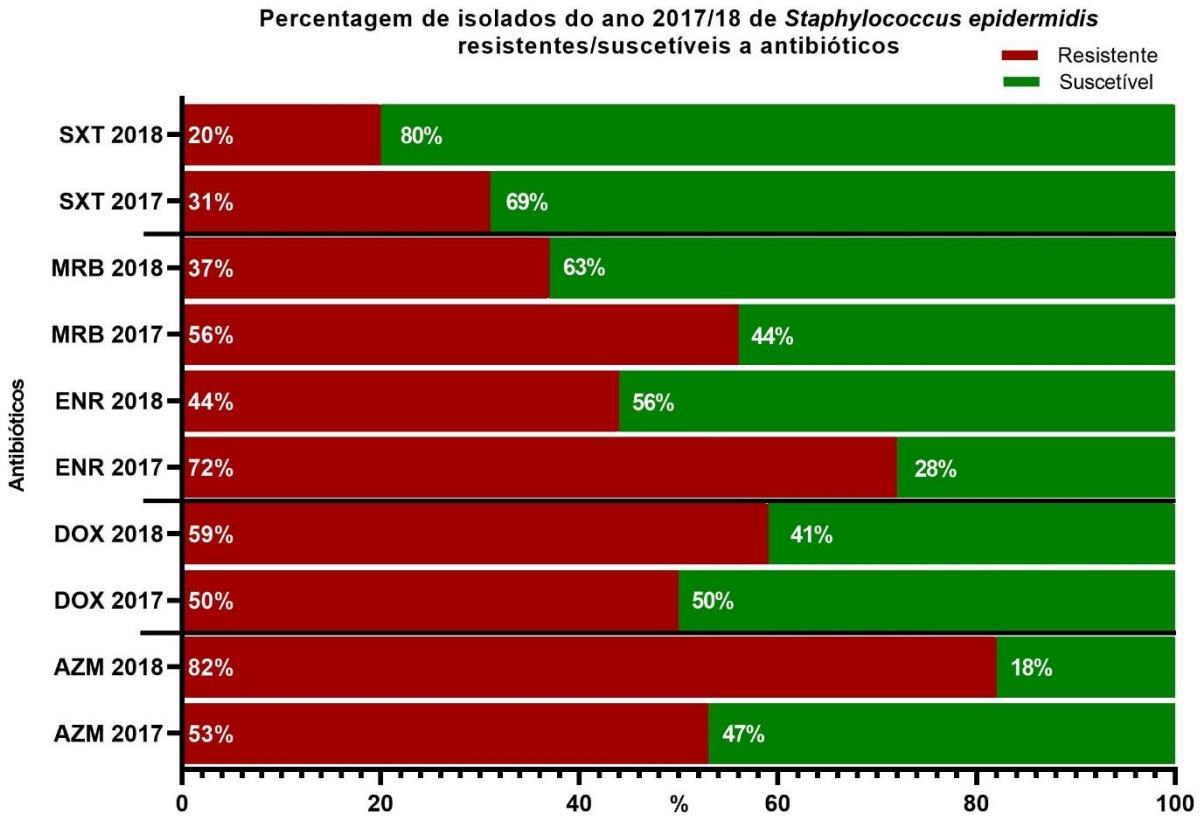

Gráfico 10 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus epidermidis* nos anos 2017 e 2018. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). AZM, azitromicina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; SXT, sulfonamida-trimetoprim.

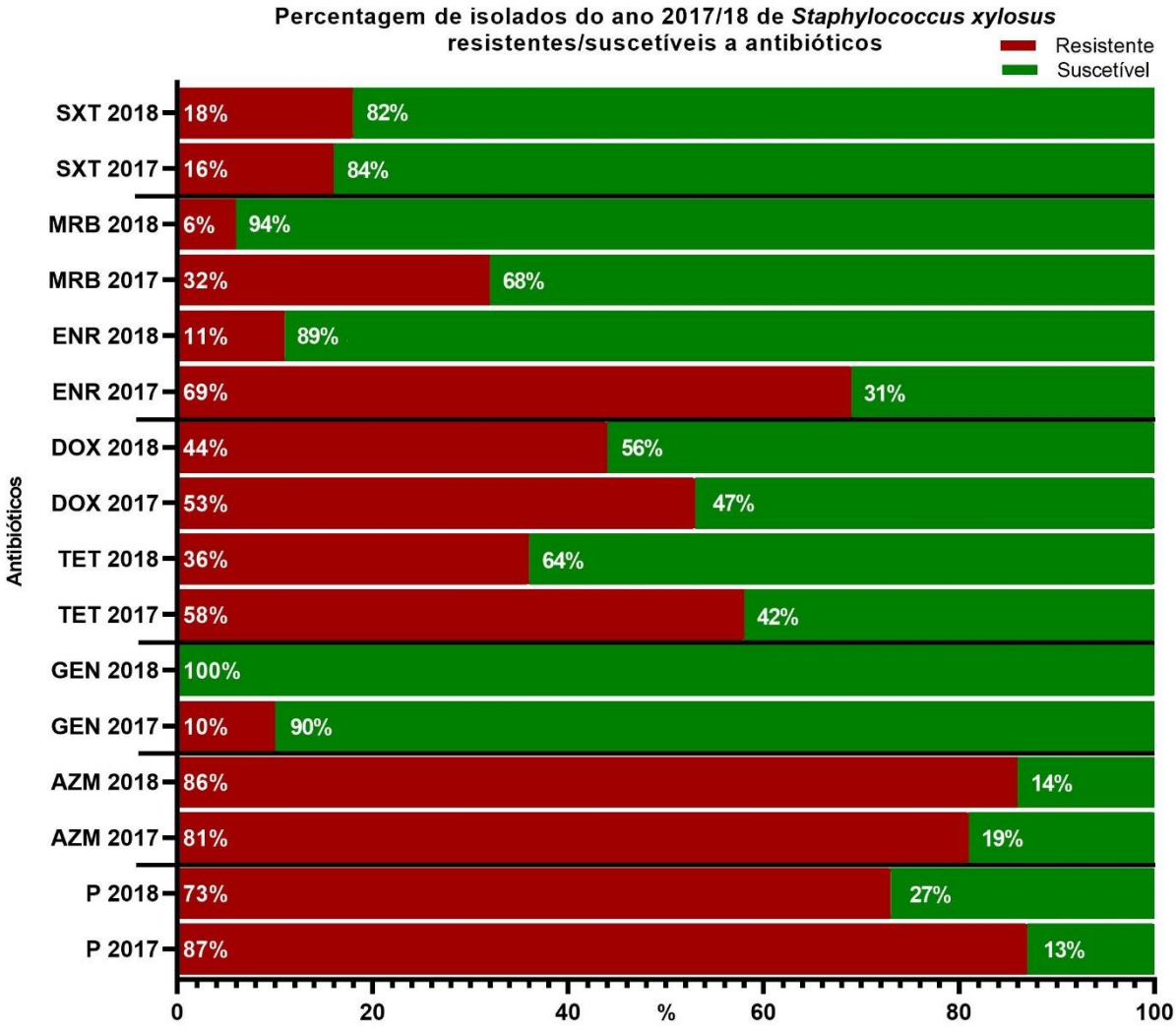

Gráfico 11 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus xylosus* nos anos 2017 e 2018. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). P, penicilina; AZM, azitromicina; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; SXT, sulfonamida-trimetoprim.

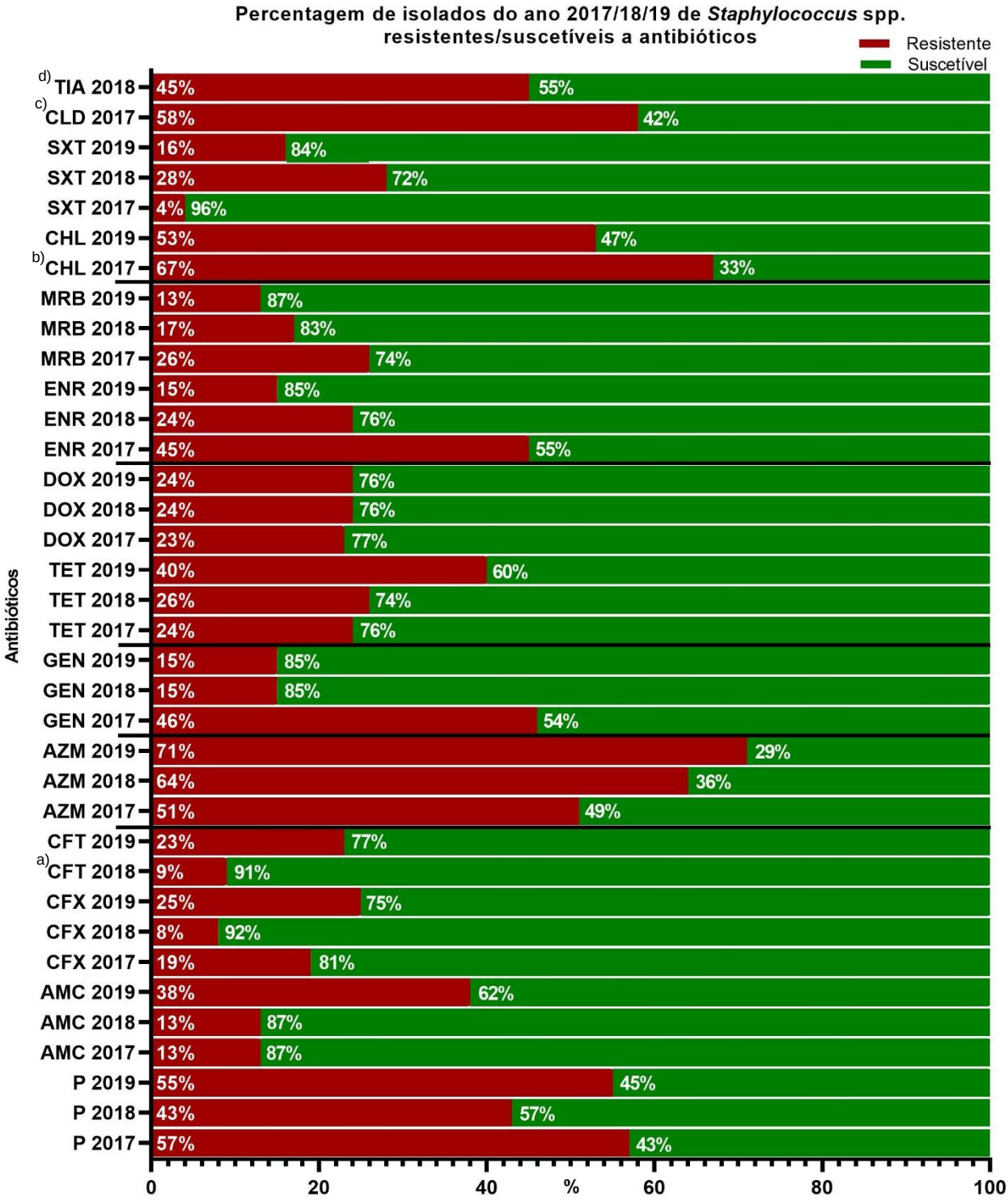

Gráfico 12 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Staphylococcus* spp. no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). P, penicilina; AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; CFX, cefalexina; CFT, ceftiofur; AZM, azitromicina; GEN, gentamicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; SXT, sulfonamida-trimetoprim; CLD, clindamicina; TIA, Tiamulina.

[a)]CFT- não foram reportados dados para o ano 2017; [b)]CHL- não foram reportados dados para o ano 2018; [c)]CLD- não foram reportados dados para os anos 2018 e 2019; [d)]TIA- não foram reportados dados para os anos 2017 e 2019.

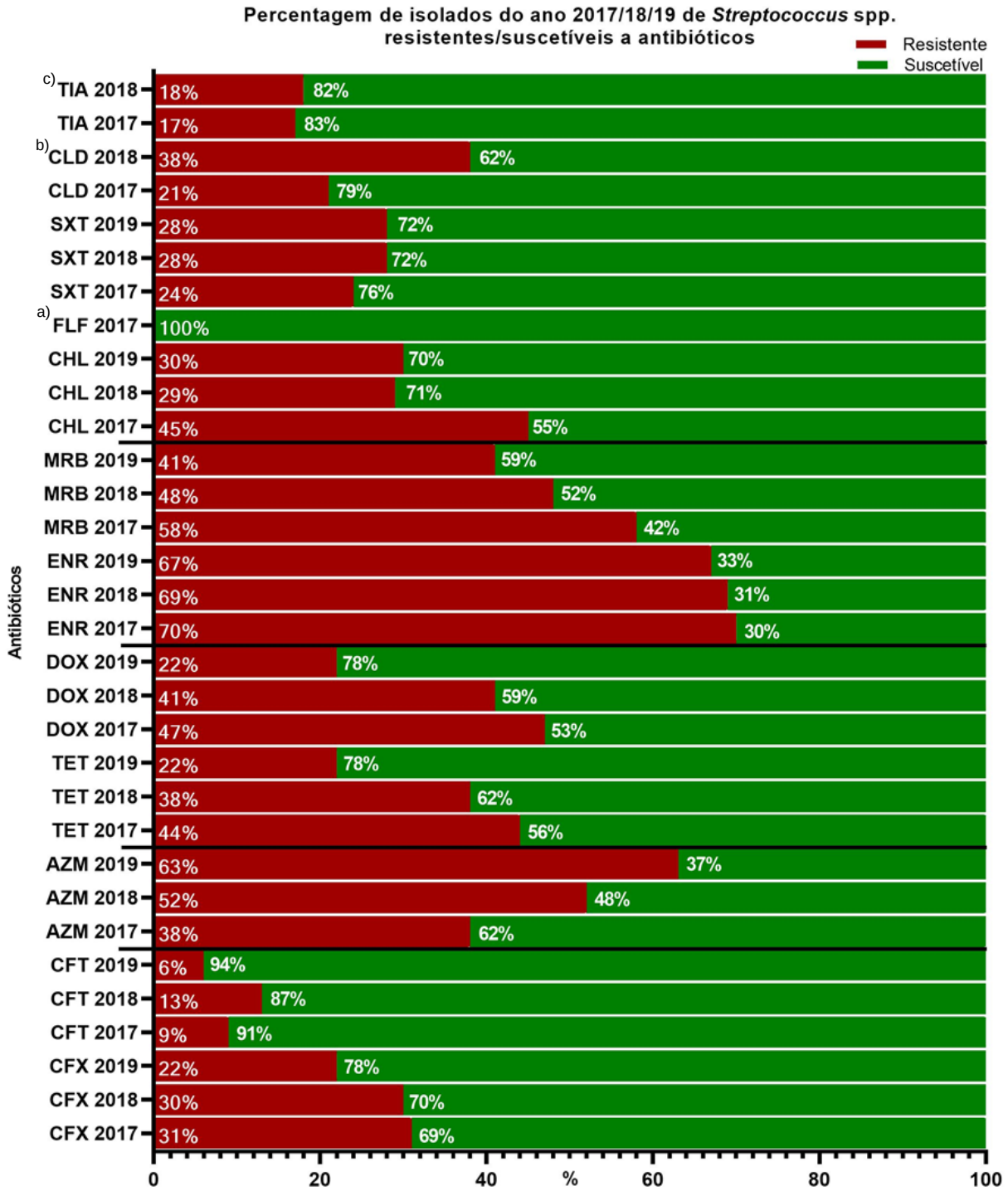

Gráfico 13 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Streptococcus* spp. no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). CFX, cefalexina; CFT, ceftiofur; AZM, azitromicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; FLF, florfenicol; SXT, sulfonamida-trimetoprim; CLD, clindamicina; TIA, Tiamulina.
[a)]FLF- não foram reportados dados para os anos 2018 e 2019; [b)]CLD/ [c)]TIA- não foram reportados dados para o ano 2019.

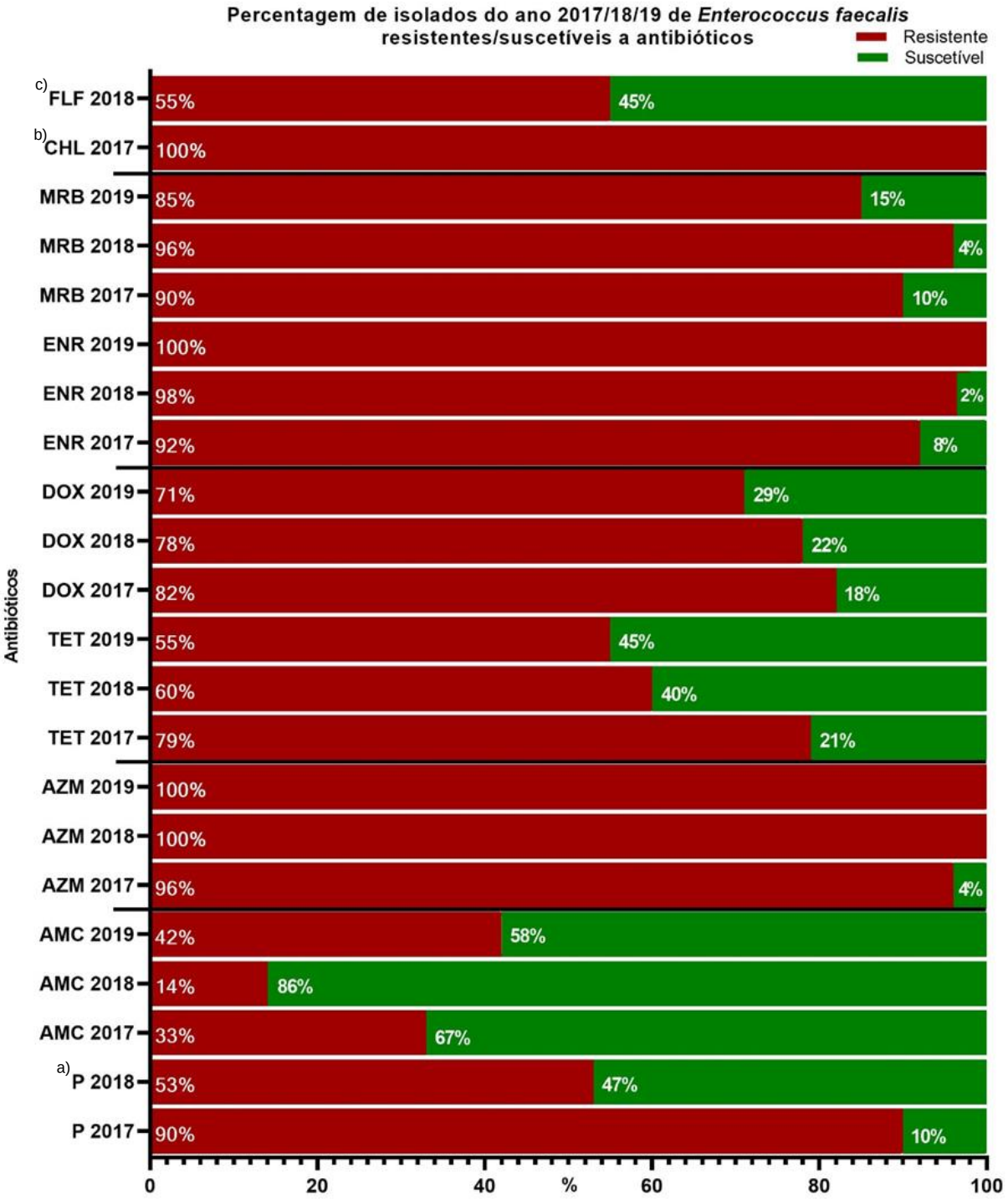

Gráfico 14 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterococcus faecalis* no triénio de 2017 a 2019. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). P, penicilina; AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; AZM, azitromicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina; CHL, cloranfenicol; FLF, florfenicol.

[a)]P- não foram reportados dados para o ano 2019; [b)]CHL- não foram reportados dados para os anos 2018 e 2019; [c)]FLF- não foram reportados dados para os anos 2017 e 2019.

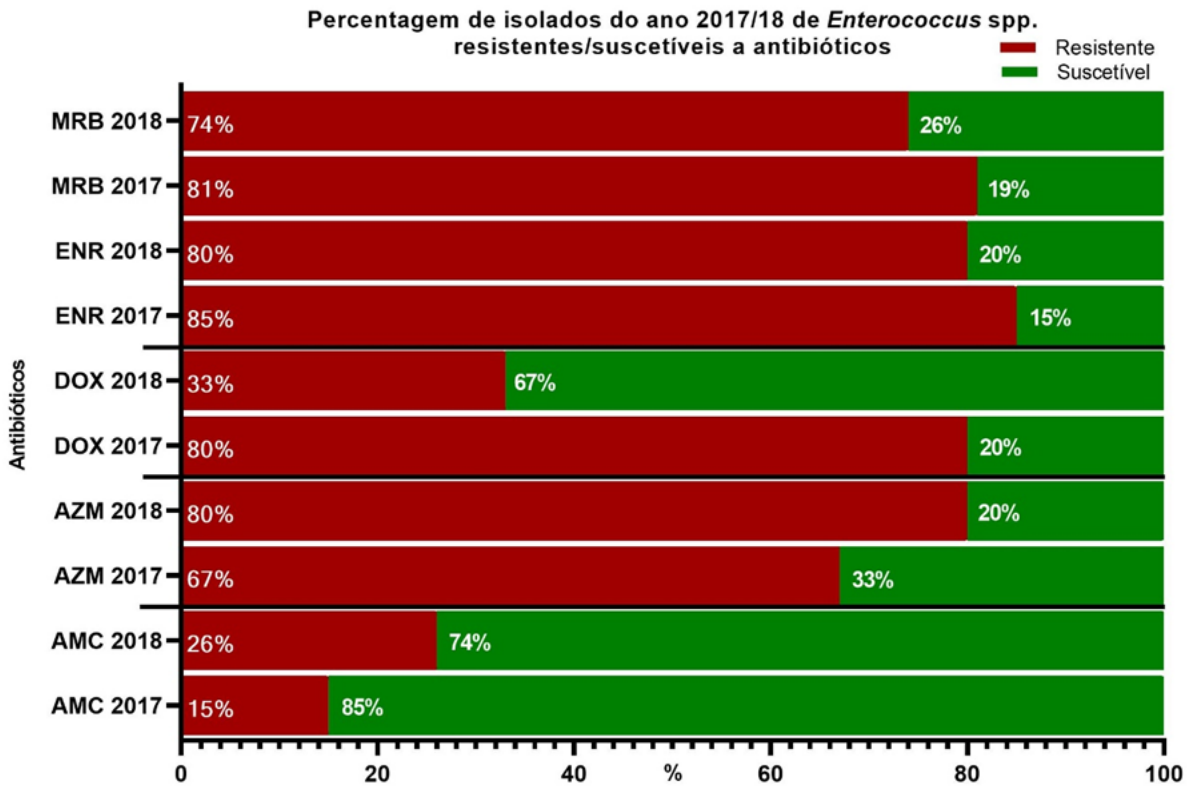

Gráfico 15 - Perfil de suscetibilidade a antibióticos de *Enterococcus* spp. nos 2017 e 2018. *p value* <0,0001 (*Chi-square*; *p* <0,05). AMC, amoxicilina com ácido clavulânico; AZM, azitromicina; DOX, doxiciclina; ENR, enrofloxacina; MRB, marbofloxacina.

Foi de notar, que na totalidade dos isolados presentes na base de dados inicial (sem *cut-off*), se observou um elevado número com perfil MDR: *E. faecalis* (n=79/125), seguido por ordem decrescente de *Streptococcus* spp. (n=68/249), *E.coli* (n=52/155), *Staphylococcus* spp. (n=51/212), *Enterobacter* spp. (n=39/131), *Klebsiella* spp. (n=32/111), *S.xylosus* (n=28/143), *S.epidermidis* (n=25/47), *S.aureus* (n=23/122), *Enterococcus* spp. (n=23/58), *Pasteurella* spp. (n=14/226), *Serratia* spp. (n=9/66), *Lactococcus* spp. (n=8/10), *Citrobacter* spp.e *Gemella* spp. (n=7/23 e 7/38, respetivamente), *Proteus* spp., *Raoultella* spp., *Salmonella* spp. e *Mannheimia* spp. (n=3/65, 3/10, 3/6, e 3/16, respetivamente), *Vagonococcus fluvialis* (n=2/3) e *Rahnella* spp., *Actinobacillus* spp. e *Chelonobacter oris* (n=1/4, 1/6 e 1/2, respetivamente) (Tabelas suplementares 5 e 6).

Ainda referente às MDR verificou-se que alguns isolados eram simultaneamente R a todos os antibióticos testados neste estudo: *Enterococcus faecalis* (n=47), seguido por ordem decrescente de *E.coli* (n=19), *Klebsiella* spp. (n=12), *S.epidermidis* (n=7), *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (n=6), *Staphylococcus* spp. e *Lactococcus* spp. (n=4), *Citrobacter* spp. (n=3), *Raoultella* spp. (n=2) e *Serratia* spp, *Pasteurella* spp e *S. xylosus* (n=1).

5. DISCUSSÃO

Sempre que possível os resultados obtidos neste estudo foram comparados com os de outros estudos com amostragem e localização geográfica similares. Contudo devido à escassez de dados publicados em animais da clínica de exóticos, passou a incluir-se dados referentes a outros animais de companhia ou ambiente de produção animal com localização geográfica europeia ou não.

Isolados de diferentes famílias, géneros e espécies foram reportados neste estudo com um perfil de moderada a elevada resistência a diferentes classes de antibióticos, incluindo perfis de MDR. Destaca-se ainda que na amostragem deste estudo foram identificadas bactérias consideradas críticas pela WHO no âmbito da medicina Humana devido à escassez de alternativas terapêuticas (WHO, 2017). Nem sempre as % da ocorrência de resistência reportada neste estudo se encontrou de acordo com os resultados oficiais publicados em França: R à cefalexina (83%) foi muito mais elevada neste estudo que no relatório publicado pela *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travai*l (ANSES) (13%), o mesmo se verificou quanto às classes das fluoroquinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas (ANSES – ENR: 4 – 8%; SXT: 66%; TET/DOX: 80%, animais de produção/cães/gatos/cavalos, 2019), contudo outras *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Pasteurella* spp. aproximaram-se dos resultados reportados oficialmente, tendo-se observado um aumento da % de isolados suscetíveis (ANSES, 2019a). No entanto outros autores relataram % de resistências mais elevadas em *E. coli* como foram os casos de Itália (ENR: 67%) e Líbano (GEN: 70%; SXT: 59%) (cunicultura: 2014/15; avicultura: 2015, respetivamente) (Agnoletti *et al*., 2017; Dandachi *et al.*, 2018). A evolução positiva da % de isolados suscetíveis (*Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* e *Pasteurella* spp.) em algumas classes de antibióticos como sejam os aminoglicosídeos, foi concordante não só com os dados nacionais reportados, como com outros (Albânia), embora nem sempre os valores percentuais coincidam (Alcaine *et al.*, 2015; ANSES, 2019a). Ainda nesta classe, *Enterobacter* spp., atualmente emergente nas medicinas humana e veterinária, apresentou uma elevada % de R (GEN: 50 a 75%), contrariamente ao que foi reportado por outros estudos (clínica de cães, gatos e equídeos) (Harada *et al*., 2017; ANSES, 2019a).

Em *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae* destacou-se a elevada % de resistência aos β-lactâmicos testados (AMC) na ordem dos 100%, o que não foi reportado a nível nacional (cunicultura) (ANSES, 2019a).

O facto de algumas classes de antibióticos terem sido exaustivamente utilizadas nas medicinas humanas e veterinárias, quer na terapêutica, profilaxia ou como promotores de crescimento animal (2006) (Regulamento 1831/2003/EC), promoveu o aumento da resistência bacteriana, em bactérias de Gram-negativo e positivo, através da THG (Grossman, 2016).

Em isolados de Gram-positivo, observou-se um aumento preocupante da % de R às classes dos macrólidos, fluoroquinolonas, anfenicóis e tetraciclinas, onde se destacou *E. faecalis*. Este perfil de

resistência foi amplamente descrito por vários autores na comunidade científica internacional, quer em ambiente de produção animal, clínica de animais de companhia, meio ambiente ou mesmo humanos saudáveis e hospitalizados (Novais *et al*., 2018; Pomba *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2014; Zaheer *et al.*, 2020).

O facto de os dados do presente estudo não encontrarem tradução no relatório nacional, devido à % da resistência reportada ser muito inferior, é de referir que o género *Enterococcus* nem sequer é descrito em cuniculturas nesse relatório (ANSES, 2019a). Esta divergência de resultados pode ser justificada através das políticas de cada país no rigor da implementação de *guidelines*, ficando, em alguns casos, quase exclusivamente dependente da responsabilidade do Médico Veterinário. Neste sentido a comunidade científica internacional alerta para a necessidade de harmonização entre os diferentes países europeus na implementação de programas de monitorização e recolha de dados, relativamente ao consumo de antimicrobianos por espécie animal, pois só assim se poderá obter uma perspetiva global e real da situação, e, consequentemente, permitir estabelecer estratégias de intervenção de forma a minimizar a emergência da resistência antimicrobiana (Garcia-Migura *et al.*, 2014). Neste contexto é reportado anualmente, na Europa e a nível nacional (França), o volume de vendas de antimicrobianos em veterinária: em 2018 (França) num total de 471,49 t, as classes mais vendidas incluíram tetraciclinas, sulfonamidas, penicilinas, aminoglicosídeos e macrólidos (38,27/17,86/14,98/11,03 e 6,81%, respetivamente) perfazendo um total de 89% do total de vendas, sendo que o ambiente de cunicultura usufruiu de 5,99% da totalidade (ANSES, 2019b). A Nível Europeu, o relatório da Agência Europeia do Medicamento (31 países) referente a 2017, reportou as tetraciclinas, penicilinas, sulfonamidas e macrólidos como as classes mais utilizadas no ambiente de produção animal (30,4/ 26,9/9,2 e 7,4%, respetivamente) (EMA, 2019).

Atualmente, as resistências aos antibióticos, são consideradas umas das principais ameaças à saúde pública, traduzindo-se em elevados índices de morbilidade e mortalidade: dados do *Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARSNet) relatam 670 000 mil infetados/ano, dos quais 33 000 traduziram-se em óbitos (ECDC, 2019). Embora haja um esforço global na implementação de medidas de prevenção, observa-se ausência de monitorização através de vigilância epidemiológica das vias de transmissão de bactérias MDR, o que seria de maior importância, pois a transferência e colonização reciprocas de bactérias MDR entre o Homem e os animais de companhia foi descrita, contudo tem sido amplamente ignorada (Dickson *et al.*, 2019). Através do estreito contacto entre estes pode ocorrer a colonização, quer de animais de companhia com estirpes resistentes ou MDR, ou determinantes de resistência, quer do Homem: um dos maiores perigos para a saúde humana é a transferência, a partir dos animais, de estirpes MRSA, *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina, VRE (*Enterococcus* resistentes à vancomicina), ESBLs ou carbapenemases (Pomba *et al*., 2017).

Por outro lado e reforçando a necessidade urgente de monitorização, há que alertar, que a utilização simultânea de desinfetantes e aditivos alimentares, que incluam, nomeadamente, compostos de cobre

(presentes quer nos alimentos de animais de produção, ou de companhia) pode contribuir para a co-selecção, manutenção e disseminação de estirpes MDR em animais e humanos, incluindo o ambiente hospitalar onde fica comprometida a eficácia dos antibióticos de primeira linha (Novais *et al*., 2018; Silveira *et al*., 2014).

Perante os resultados preocupantes revelados neste estudo, em que os animais exóticos parecem constituir um reservatório de isolados MDR, assume extrema importância a implementação de *guidelines*, monitorização da evolução dos perfis de suscetibilidade, de forma a ser possível implementar estratégias para o uso racional de antimicrobianos, onde o Médico Veterinário desempenha um papel preponderante ao ter em consideração as recomendações das entidades oficiais (EMA, ECDC, EFSA, EEA, OIE) no que diz respeito à classificação e utilização adequada destes compostos, contribuindo assim, inequivocamente, para uma política de *One Health* e para o cumprimento dos objetivos da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável no combate à resistência aos antimicrobianos (UN, 2015).

São necessários mais estudos de suscetibilidade aos antimicrobianos em animais exóticos de companhia, para que seja dada a conhecer a dimensão real do problema a nível global e, consequentemente, implementar medidas no combate à AMR.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnoletti, F., Brunetta, R., Bano, L., Drigo, I., & Mazzolini, E. (2017). Longitudinal study on antimicrobial consumption and resistance in rabbit farming. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *51*(2), 197–205. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.007

Alcaine, S. D., Molla, L., Nugen, S. R., & Kruse, H. (2015). Results of a pilot antibiotic resistance survey of Albanian poultry farms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *4*, 60–64. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.11.003

Anses (2019b). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2018. Édition scientifique, Agence nationale du médicament vétérinaire, Delphine Urban, Anne Chevance et Gérard Moulin, Anses-ANMV, Novembre 2019, rapport annuel.

Anses (2019a). Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2018, Lyon et Ploufragan-Plouzané-Niort, France, novembre 2019, rapport.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Publishing Group*, *13*(1), 42–51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M., & Martinez, J. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, *4*(1), 14. https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014

Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). *Antibacterial drug discovery in the resistance era*. https://doi.org/10.1038/nature17042

Butaye, P., Van Duijkeren, E., Prescott, J. F., & Schwarz, S. (2014). Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. *Veterinary Microbiology*, *171*(3–4), 269–272. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.04.009

CA-SFM (2013). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations 2013, France.

CA-SFMVET (2018). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations vétérinaires 2018, France.

CA-SFMVET (2019). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Recommandations vétérinaires 2019, France.

Costa, A., & Silva, G. J. da. (2018). Resistência à Colistina e sua Disseminação : Implicações em Saúde Pública Colistin Resistance and its Dissemination : Implications for Public. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*, *10*(1 (janeiro)), 47–52. https://doi.org/https://doi.org/10.25756/rpf.v10i1.162

D`costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. In *Nature* (Vol. 477, Issue 7365, pp. 457–461). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nature10388

Dandachi, I., Sokhn, E. S., Dahdouh, E. A., Azar, E., El-Bazzal, B., Rolain, J. M., & Daoud, Z. (2018). Prevalence and characterization of multi-drug-resistant gram-negative bacilli isolated from lebanese poultry: A nationwide study. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAR), 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00550

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *American Society for Microbiology*, *74*(3), 417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10

Dickson, A., Smith, M., Smith, F., Park, J., King, C., Currie, K., Langdridge, D., Davis, M., & Flowers, P. (2019). Understanding the relationship between pet owners and their companion animals as a key context for antimicrobial resistance-related behaviours: an interpretative phenomenological analysis. *Health Psychology and Behavioral Medicine*, *7*(1), 45–61. https://doi.org/10.1080/21642850.2019.1577738

Dolejska, M., & Papagiannitsis, C. C. (2018). *Plasmid-mediated resistance is going wild*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.010

EU. (2015). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Acedido em 26 de Maio de 2020 em https://ec.europa.eu/health/amr/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf

European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC.

European Comission. Regulation nº 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official JL* 268, pp. 29-43.

European Medicines Agency. (2019) European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017'. (EMA/294674/2019)

Fleming A. (1945). Pencillin, Nobel Lecture. Acedido em 12 de Abril de 2020 em https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf

Garcia-Migura, L., Hendriksen, R. S., Fraile, L., & Aarestrup, F. M. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, *170*(1–2), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.013

Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(5), 849–853. https://doi.org/10.3201/eid2305.161556

Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(4). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387

Harada, K., Shimizu, T., Mukai, Y., Kuwajima, K., Sato, T., Kajino, A., Usui, M., Tamura, Y., Kimura, Y., Miyamoto, T., Tsuyuki, Y., Ohki, A., & Kataoka, Y. (2017). Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in Enterobacter spp. isolates from companion animals in Japan. *PLoS ONE*, *12*(3), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174178

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, *33*(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Karmakar, P., & Gaitonde, V. (2019). Promising Recent Strategies with Potential Clinical Translational Value to Combat Antibacterial Resistant Surge. *Medicines*, *6*(1), 21. https://doi.org/10.3390/medicines6010021

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, *127*(1), 4–22. https://doi.org/10.1177/003335491212700103

Levy, S. B., & Bonnie, M. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, *10*(12S), S122–S129. https://doi.org/10.1038/nm1145

Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161–168. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *April 2016*, 95–99. https://doi.org/10.1142/9789813209558_0015

Nikaido, H. (2009). *Multidrug Resistance in Bacteria*. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923

Novais, C., Campos, J., Freitas, A. R., Barros, M., Silveira, E., Coque, T. M., Antunes, P., & Peixe, L. (2018). Water supply and feed as sources of antimicrobial-resistant Enterococcus spp. in aquacultures of rainbow trout (Oncorhyncus mykiss), Portugal. *Science of the Total Environment*, *625*, 1102–1112. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.265

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4), 1–61.

Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G., & Desai, M. M. (2015). Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533

Perry, J., Waglechner, N., & Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197

Petrova, M., Kurakov, A., Shcherbatova, N., & Mindlin, S. (2014). Genetic structure and biological properties of the first ancient multiresistance plasmid pKLH80 isolated from a permafrost bacterium. *Microbiology (United Kingdom)*, *160*, 2253–2263. https://doi.org/10.1099/mic.0.079335-0

Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M. A., Pyörälä, S., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., John Threlfall, E., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H., & Törneke, K. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(4), 957–968. https://doi.org/10.1093/jac/dkw481

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., & Fanning, S. (2016). Introductory Bacteriology p.2-34. Concise review of Veterinary microbiology. In *Blackwell Publishingpress* (second, Vol. 1). Wiley Blackwell, UK.

Santiago-Rodriguez, T. M., Fornaciari, G., Luciani, S., Dowd, S. E., Toranzos, G. A., Marota, I., Cano, R. J., & Wilson, B. A. (2015). Gut microbiome of an 11th century A.D. Pre-Columbian andean mummy. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138135

Silveira, E., Freitas, A. R., Antunes, P., Barros, M., Campos, J., Coque, T. M., Peixe, L., & Novais, C. (2014). Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among Enterococcus from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(4), 899–906. https://doi.org/10.1093/jac/dkt479

Sirijan Santajit, & Nitaya Indrawattana. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE Pathogens. *PBioMed Research International*, *2016*(2475067), 1–8.

Sousa JC, Machado E, Novais C, Peixe L, Amorim J & Monteiro N. (2016). Antibióticos. Ed. Universidade Fernando Pessoa in Principais Grupos de Antibióticos antiparietais usados na Terapêutica. Porto, Portugal.

UN General Assembly. (2015). Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. A/RES/70/1. Acedido em 18 de Junho de 2020 em https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.html

World Health Organization (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12).

Wright, G. D. (2007). *The antibiotic resistome : the nexus of chemical and genetic diversity*. *5*(March), 175–186. https://doi.org/10.1038/nrmicro1614

Yilmaz, Ç., & Özcengiz, G. (2016). *Antibiotics : Pharmacokinetics , toxicity , resistance and multidrug efflux pumps*. *133*, 43–62. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.005

Zaheer, R., Cook, S. R., Barbieri, R., Goji, N., Cameron, A., Petkau, A., Polo, R. O., Tymensen, L., Stamm, C., Song, J., Hannon, S., Jones, T., Church, D., Booker, C. W., Amoako, K., Van Domselaar, G., Read, R. R., & McAllister, T. A. (2020). Surveillance of Enterococcus spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61002-5

Zhang, Y. H. P., Sun, J., & Ma, Y. (2016). Biomanufacturing: history and perspective. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *44*(4–5), 773–784. https://doi.org/10.1007/s10295-016-1863-2

ANEXO I. TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1 – Número de isolados consoante a espécie/género animal.

Pequenos mamíferos n total = 1555	Aves n total = 287	Répteis n total = 208
Oryctolagus cuniculus n= 1173	*Phasianidae* n= 53	*Testudines* n= 85
Cavia porcellus n= 122	*Psittacus erithacus* n= 42	*Pogona vitticeps* n= 22
Murinae n= 120	*Ara* n= 29	*Iguanidae* n= 15
Mustela putorius furo n= 75	Cacatua n= 21	*Python regius* n= 14
Chinchilla n= 25	*Falco peregrinus* n= 17	*Chamaeleonidae* n= 13
Erinaceus europaeus n= 14	*Columbidae* n= 16	*Boa constrictor* n= 11
Meriones unguiculatus n= 9	*Amazona* n= 13	*Gekkonidae* n= 9
Octodon degus n= 8	*Melopsittacus undulatus* n= 12	*Varanidae* n= 7
Phodopus n= 7	*Nymphicus hollandicus* n= 12	*Elaphe* n= 6
Mustela lutreola n= 2	*Parabuteo unicinctus* n= 12	*Python molurus* n= 5
	Ecletus roratus n= 11	*Gongylophis colubrinus* n= 4
	Agapornis n= 8	*Physignathus cocincinus* n= 4
	Anatidae n= 7	*Naja* n= 3
	Aquila chrysaetos n= 5	*Pantherophis guttatus* n= 3
	Aquila rapax n= 4	*Atheris hispida* n= 2
	Falco rusticolus n= 4	*Crocodylia* n= 2
	Hieraaetus pennatus n= 4	*Morelia spilota* n= 2
	Serinus canaria domestica n= 4	*Epicrates cenchria* n= 1
	Strigiformes n= 4	
	Gyps rueppellii n= 3	
	Aratinga n= 2	
	Cyanoramphus auriceps n= 2	
	Falco jugger n= 2	

n= número de isolados

Tabela suplementar 2 - Número de isolados associados a diversas patologias e origem da amostra biológica.

Género/espécie / Patologia de origem da amostra biológica	*Escherichia coli*	*Enterobacter spp.*	*Klebsiella spp.*	*Proteus spp.*	*Serratia spp.*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pasteurella spp.*	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus epidermidis*	*Staphylococcus xylosus*	*Staphylococcus spp.*	*Streptococcus spp.*	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus spp.*	Outros
Nasais	15	37	39	9	20	35	123	28	10	37	53	54	25	8	70
Cutâneas	23	20	13	15	2	14	15	29	8	11	31	26	28	10	42
Orais	29	20	16	13	12	21	16	3	4	8	19	74	12	14	35
Oculares	11	14	11	6	4	15	26	12	0	18	35	34	13	1	40
Aparelho auditivo	5	6	11	5	11	28	25	40	12	7	42	12	4	2	12
Gastrointestinais	35	14	10	5	7	2	0	5	3	0	9	8	20	24	21
Ósseas	11	6	5	6	4	8	16	3	2	1	7	27	8	2	9
Órgãos internos	16	6	1	1	4	1	1	0	4	5	4	7	6	3	8
Pulmonares	6	6	4	2	2	2	4	2	3	2	6	6	3	0	11
Sistema reprodutor	4	1	0	1	0	1	0	0	1	1	3	0	1	0	2
Sistema urinário	0	1	1	2	0	0	0	0	0	3	3	1	5	0	7

Tabela suplementar 3 - Número de isolados de bactérias de Gram-negativo com perfil de resistência a antibióticos.

Bactérias de Gram-negativo	Antibióticos														
	AMC	**P**	**CFX**	**CFT**	**AZM**	**GEN**	**TET**	**DOX**	**ENR**	**MRB**	**CHL**	**FLF**	**SXT**	**CLD**	**TIA**
E. coli															
Ano 2017, n=43/188[a)]	18/20[b)]					7/12		34/36	10/38	9/34	7/10		8/41		
Ano 2018, n=72/271	32/35		15/18			11/26	6/11	54/59	14/67	11/62	11/12	2/12	15/56		
Ano 2019, n=40/175	20/21			1/10		6/15	8/13	31/32	11/40	10/38			9/34		
***Enterobacter* spp.**															
Ano 2017, n=39/188						18/24	9/10	31/34	17/36	12/39			13/35		
Ano 2018, n=56/271						17/31	15/20	44/47	16/51	10/49			9/38		
Ano 2019, n=36/175				8/10		10/20		33/33	11/33	2/34			9/31		
***Klebsiella* spp.**															
Ano 2017, n=34/188						13/16	5/12	25/28	18/33	9/34	2/10		10/30		
Ano 2018, n=49/271	12/12					13/30	8/15	35/38	27/47	16/47			18/42		
Ano 2019, n=28/175						8/20	5/13	17/19	8/27	4/27			3/19		
***Proteus* spp.**															
Ano 2017, n=20/188						5/13			5/20	4/20			3/10		
Ano 2018, n=29/271						1/15			5/28	2/28			9/22		
***Serratia* spp.**															
Ano 2018, n=25/271						1/15	9/10	23/23	1/24	0/23			1/21		
Ano 2019, n=29/175						2/19		20/21	3/28	1/28			0/20		
Pseudomonas aeruginosa															
Ano 2017, n=38/58				9/10		7/21									
Ano 2018, n=58/77				16/16		14/50									
Ano 2019, n=31/41				12/12		3/29									
***Pasteurella* spp.**															
Ano 2017, n=77/84		17/38	1/10			6/18	5/37	31/72	9/74	3/76	0/15	0/16	2/68		3/11
Ano 2018, n=88/109		18/49	1/11	0/14		7/48	2/42	10/79	7/83	3/87			2/69		7/28
Ano 2019, n=61/83		8/30	1/13	3/18		4/36	1/21	8/54	5/55	2/59			1/44		1/16

[a)] número=n° de isolados do género/espécie / n° total de isolados por família; [b)] n° de isolados resistentes a antibióticos/ n° total de isolados testados a antibióticos.

Tabela suplementar 4 - Número de isolados de bactérias de Gram-positivo com perfil de resistência a antibióticos.

Bactérias de Gram-positivo	Antibióticos														
	AMC	**P**	**CFX**	**CFT**	**AZM**	**GEN**	**TET**	**DOX**	**ENR**	**MRB**	**CHL**	**FLF**	**SXT**	**CLD**	**TIA**
S. aureus															
Ano 2017, n=44/193[a)]		11/17[b)]			23/39	8/18	3/11	11/39	18/42	10/43	15/15		3/34		
Ano 2018, n=52/198		7/21			31/43	9/26	2/19	4/42	7/49	7/50			2/40		
Ano 2019, n=26/122		4/13			20/23	0/13	0/10	1/20	3/25	3/25			0/21		
S. *epidermidis*															
Ano 2017, n=18/193					9/17			8/16	13/18	10/18			4/13		
Ano 2018, n=20/198					14/17			7/17	8/18	7/19			2/10		
S. xylosus															
Ano 2017, n=42/193		13/15			26/32	2/21	7/12	20/38	27/39	13/41			5/31		
Ano 2018, n=37/198		8/11			24/28	0/20	5/14	14/32	4/35	2/34			5/28		
***Staphylococcus* spp.**															
Ano 2017, n=70/193	2/16	13/23	3/16		26/51	16/35	7/29	13/57	31/69	18/69	12/18		2/50	7/12	
Ano 2018, n=78/198	2/16	12/28	1/12	1/11	44/69	7/46	9/34	15/62	18/74	12/72			15/54		5/11
Ano 2019, n=64/122	6/16	12/22	4/16	3/13	32/45	6/41	6/15	12/49	9/60	8/60	9/17		7/45		
***Streptococcus* spp.**															
Ano 2017, n=84/87			4/13	1/11	27/72		7/16	36/76	54/77	49/84	9/20	0/14	16/68	3/14	2/12
Ano 2018, n=96/103			7/23	2/16	46/88		10/26	36/87	60/87	40/83	5/17		19/69	6/16	2/11
Ano 2019, n=69/69			4/18	1/18	43/68		4/18	13/59	42/63	27/66	3/10		13/47		
Enterococcus faecalis															
Ano 2017, n=40/62	6/18	9/10			25/26		11/14	28/34	35/38	36/40	11/11				
Ano 2018, n=58/89	4/28	8/15			43/43		9/15	35/45	55/56	48/50		6/11			
Ano 2019, n=27/41	5/12				18/18		6/11	12/17	26/26	22/26					
***Enterococcus* spp.**															
Ano 2017, n=22/62	2/13				8/12			12/15	17/20	17/21					
Ano 2018, n=28/89	5/19				20/25			7/21	24/30	20/27					

[a)] número=n° de isolados do género/espécie / n° total de isolados por família; [b)] n° de isolados resistentes a antibióticos/ n° total de isolados testados a antibióticos.

Tabela suplementar 5 – Número de bactérias de Gram-negativo MDR isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves (totalidade de isolados da amostra, sem cut-offs).

Bactérias de Gram-negativo	**Ano 2017 (n)**	**Ano 2018 (n)**	**Ano 2019 (n)**
Enterobacteriaceae	71	30	49
Citrobacter spp.	4/12	1/6	2/5
Escherichia coli	19/43	13/72	20/40
Enterobacter spp.	19/39	6/56	14/36
Erwinia pyrifolia	-	-	-
Klebsiella spp.	14/34	10/49	8/28
Morganella spp.	1/3	0/8	0/3
Pantoea spp.	-	-	-
Proteus spp.	0/20	0/29	3/16
Providencia rettgeri	-	-	-
Rahnella spp.	1/2	0/1	0/1
Raoultella spp.	3/7	0/2	0/1
Salmonella spp.	2/2	0/1	1/3
Serratia spp.	8/12	0/25	1/29
Tatumella ptyseos	-	-	-
Yersinia pseudotuberculosis	-	-	-
Pseudomonadaceae	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-
Pseudomonas spp.	-	-	-
Pasteurellaceae	8	4	7
Actinobacillus spp.	-	0/3	1/3
Chelonobacter oris	-	1/2	-
Haemophilus spp.	-	-	-
Mannheimia spp.	0/4	0/4	3/8
Pasteurella spp.	8/77	3/88	3/61

n= número de isolados MDR/ número total de isolados ; - = ausência de isolados MDR

Tabela suplementar 6 - Número de bactérias de Gram-positivo MDR isoladas de pequenos mamíferos, répteis e aves (totalidade de isolados da amostra, sem cut-offs).

Bactérias de Gram-positivo	**Ano 2017 (n)**	**Ano 2018 (n)**	**Ano 2019 (n)**
Staphylococcaceae	66	43	25
Gemella spp.	4/19	3/11	0/8
Macrococcus caseolyticus	-	-	-
Staphylococcus aureus	14/44	7/52	2/26
Staphylococcus epidermidis	9/18	9/20	7/9
Staphylococcus xylosus	18/42	8/87	2/14
Staphylococcus spp.	21/70	16/78	14/64
Streptococcaceae	26	37	13
Lactococcus spp.	1/3	7/7	-
Streptococcus spp.	25/84	30/96	13/69
Enterococcaceae	34	50	20
Enterococcus faecalis	25/40	38/58	16/27
Enterococcus spp.	9/22	10/22	4/14
Vagonococcus fluvialis	-	2/3	-

n= número de isolados MDR/ número total de isolados ; - = ausência de isolados MDR

Tabela suplementar 7 – Perfil fenotípico de resistências em bactérias de Gram-negativo MDR a diferentes classes de antibióticos.

Perfil fenotípico de resistência	n		n		n		n
Escherichia coli		***Enterobacter* spp.**		***Klebsiella* spp.**		***Salmonella* spp.**	
βLC-TET-FL	8	AMN-TET-FL-SUL	6	βLC-TET-FL	10	βLC-AMN-FL-ANF	1
βLC-TET-ANF	4	βLC-TET-FL	4	AMN-TET-FL-SUL	7	AMN-TET-FL	1
βLC-TET-POL-FL	4	βLC-AMN-TET-FL	3	TET-POL-FL	5	TET-POL-FL	1
βLC-FL-ANF	3	AMN-TET-ANF-PL	3	TET-FL-SUL	3		
βLC-TET-PL	3	AMN-TET-POL-FL-SUL-PL	3	TET-POL-FL-SUL	3	***Actinobacillus* spp.**	
AMN-TET-FL	3	TET-FL-SUL-PL	3	βLC-AMN-TET-FL	2	βLC-TET-FL-PL	1
TET-FL-SUL	3	βLC-AMN-TET	2	βLC-AMN-TET-FL-SUL	1		
βLC-AMN-TET	2	AMN-FL-ANF	2	AMN-TET-POL	1	***Chelonobacter oris***	
βLC-AMN-TET-FL-SUL	2	AMN-TET-SUL	2			βLC-AMN-TET	1
βLC-TET-FL-SUL	2	TET-FL-ANF	2	***Serratia* spp.**			
βLC-TET-POL	2	TET-FL-SUL	2	TET-FL-SUL	3	***Mannheimia* spp.**	
βLC-TET-SUL	2	βLC-AMN-TET-ANF-PL	1	TET-FL-PL	2	βLC-TET-FL	2
AMN-TET-ANF	2	βLC-AMN-TET-POL-FL-SUL	1	βLC-TET-FL	1	βLC-AMN-TET-FL	1
AMN-TET-FL-SUL	2	βLC-TET-FL-SUL	1	AMN-TET-FL-ANF	1		
TET-FL-ANF	2	βLC-TET-POL-FL-ANF	1	AMN-TET-FL-ANF-SUL	1	***Pasteurella* spp.**	
TET-POL-FL	2	βLC-TET-POL-FL-ANF-SUL	1	AMN-TET-FL-SUL	1	βLC-AMN-TET	3
AMN-POL-ANF	1	TET-FL-ANF-SUL	1			βLC-TET-FL	3
AMN-POL-PL	1	TET-POL-ANF	1	***Morganella* spp.**		βLC-AMN-FL	1
AMN-TET-POL	1			TET-FL-SUL	1	βLC-TET-FL-SUL	1
TET-ANF-PL	1	***Citrobacter* spp.**				βLC-TET-SUL	1
TET-FL-ANF-SUL	1	βLC-POL-AMN-TET-POL-FL-ANF	1	***Rahnella* spp.**		AMN-FL-SUL	1
TET-FL-SUL-PL	1	βLC-POL-AMN-TET-POL-FL-ANF-SUL-PL	1	AMN-TET-FL-ANF	1	AMN-TET-FL	1
		βLC-TET-FL	1			AMN-TET-FL-SUL	1
***Proteus* spp.**		AMN-TET-FL-SUL	1	***Raoultella* spp.**		TET-FL-PL	1
βLC-AMN-FL-SUL	1	AMN-TET-POL	1	βLC-TET-SUL	1	TET-FL-SUL	1
βLC-AMN-FL-SUL-PL	1	TET-FL-ANF-SUL	1	βLC-TET-POL-FL-SUL	1		
AMN-FL-SUL	1	TET-POL-SUL	1	βLC-AMN-TET-POL-FL-ANF-SUL	1		

n=número de isolados; βLC, β-lactâmicos; AMN, aminoglicosídeos; TET, tetraciclinas; POL, polimixinas; FL, fluoroquinolonas; ANF, anfenicóis; SUL, sulfonamidas; PL,pleuromutilinas.

Tabela suplementar 8 – Perfil fenotípico de resistências em bactérias de Gram-positivo MDR a diferentes classes de antibióticos.

Perfil fenotípico de resistência	n		n		n		n
S. aureus		***Staphylococcus* spp.**		***Gemella* spp.**		***E. faecalis***	
MAC-AMN-FL-ANF	3	βLC-MAC-TET	7	MAC-TET-SUL	3	MAC-TET-FL	29
βLC-AMN-FL-ANF	2	βLC-MAC-FL-SUL	6	MAC-AMN-FL	2	βLC-MAC-TET-FL	22
βLC-AMN-TET	2	βLC-MAC-AMN-FL	5	MAC-TET-FL-SUL	1	MAC-TET-FL-ANF	10
βLC-MAC-AMN	2	AMN-TET-FL	5	TET-FL-ANF	1	βLC-MAC-TET-FL-ANF	9
MAC-TET-FL	2	βLC-MAC-ANF	4			MAC-TET-FL-ANF-PL	4
βLC-MAC-AMN-TET-FL-ANF-SUL-PL	1	βLC-MAC-TET-FL	4	***Lactococcus* spp.**		TET-FL-ANF	3
βLC-MAC-ANF	1	FUS-AMN-FL	4	βLC-TET-FL-SUL	5	MAC-FL-ANF	2
βLC-MAC-TET-FL	1	βLC-AMN-TET	3	MAC-FL-SUL	2		
βLC-MAC-TET-FL-ANF	1	βLC-MAC-TET-SUL	3	MAC-TET-FL	1	***Enterococcus* spp.**	
βLC-TET-FL-ANF	1	MAC-AMN-TET-FL-ANF	3			MAC-TET-FL	5
AMN-FL-ANF	1	MAC-TET-FL-PL	3	***Streptococcus* spp.**		βLC-MAC-TET-FL	4
AMN-TET-FL	1	βLC-MAC-AMN-TET-FL-SUL	1	MAC-TET-FL	19	MAC-FL-ANF	4
FUS-βLC-MAC-AMN-TET-FL-ANF-SUL	1	FUS-βLC-MAC-AMN-TET-FL	1	TET-FL-SUL	8	βLC-FL-ANF	2
FUS-MAC-FL	1	FUS-FL-ANF	1	βLC-MAC-TET-FL	7	βLC-MAC-FL	2
MAC-AMN-ANF	1	FUS-MAC-AMN	1	MAC-TET-FL-ANF-SUL	6	βLC-MAC-FL-ANF	2
MAC-TET-FL-SUL	1			MAC-TET-SUL	6	MAC-TET-FL-ANF	2
TET-FL-ANF	1	***S. epidermidis***		MAC-TET-FL-SUL	5	FL-TET-ANF	1
		βLC-MAC-TET-FL	7	βLC-MAC-TET-FL-SUL	4	TET-ANF-PL	1
S. xylosus		βLC-MAC-FL	5	MAC-TET-FL-LIN	4		
MAC-TET-FL	10	βLC-AMN-TET-FL	2	βLC-MAC-FL	3	***Vagonococcus spp.***	
βLC-MAC-FL	6	βLC-MAC-AMN-TET-FL-SUL	2	MAC-FL-SUL-PL	3	MAC-TET-FL	2
βLC-MAC-TET-FL	5	FUS-βLC-MAC-AMN-TET-FL-SUL	2	βLC-FL-ANF-SUL	1		
βLC-TET-FL-ANF	3	MAC-AMN-TET-FL-SUL	2	βLC-MAC-TET-FL-ANF-SUL	1		
MAC-TET-FL-SUL	3	MAC-TET-FL	2	MAC-TET-PL	1		
MAC-AMN-FL	1	βLC-TET-FL-ANF	1				
		AMN-TET-FL	1				
		MAC-AMN-FL	1				

n=número de isolados; FUS, fusidanas; βLC, β-lactâmicos; MAC, macrólidos; AMN, aminoglicosídeos; TET, tetraciclinas; FL, fluoroquinolonas; ANF, anfenicóis; SUL, sulfonamidas;PL,pleuromutilinas; LIN, lincosamidas.

ANEXO II. LICENÇAS DE UTILIZAÇÃO DE IMAGEM

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 21, 2020

This Agreement between Mr. Sandro Cardoso ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4853811008036
License date	Jun 21, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed Content Title	The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity
Licensed Content Author	Gerard D. Wright
Licensed Content Date	Dec 31, 1969

48

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de exóticos
Institution name	Escola Universitária Vasco da Gama
Expected presentation date	Jul 2020
Order reference number	Timeline

Portions	Timeline | Antibiotic drug discovery
Requestor Location	Mr. Sandro Cardoso Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Anseriz, Coimbra 3305-010 Portugal Attn: Mr. Sandro Cardoso
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH
Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

1. 2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

1. 3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also

2. Scope of Licence

2. 1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

2. 2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

2. 3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to _____ _____ _ __ _____/____ _____ _ __ _____ for these rights.

2. 4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

2. 5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines, as amended from time to time.

3. Duration of Licence

3. 1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

51

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months

Post on a website 12 months
Presentations 12 months
For any eBook, eBook chapter or eJournal, permission is granted for the life of the edition on the date on which permission is granted. In the case of reuse of material for a subsequent edition, permission should be re-cleared.
Reuse in a dissertation/thesis 3 years from publication date
Updates 12 months
Permission is granted for a maximum of 25 copies unless otherwise specified. If the request is for more than 25 copies, the terms of use may be amended and additional fees may apply.
If no portion of the licensed content is used for a period of three (3) years, then this licence will automatically terminate at the end of that three (3) year period.
Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/), and for a period of no longer than 36 months from the date of publication.

	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

52

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL

Books and journals

OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND
WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. 1. ***BOOKS ONLY:*** Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (____.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

For Journal Content:
Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)

Appendix 1 — Acknowledgements:

For **Advance Online Publication papers:**
Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)

For Adaptations/Translations:
Adapted/Translated by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)

_____ epublication from the British Journal of Cancer, the following edit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: : [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT]** (year of publication)

For **Advance Online Publication** papers:
Reprinted by permission from The [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For Book content:
Reprinted/adapted by permission from [**the Licensor**]: [**Book Publisher** (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [**Book Title**] by [**Book author**(s)] [**COPYRIGHT**] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.2

54

Questions? _____ care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Customer
Customer
For any r

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 21, 2020

This Agreement between Mr. Sandro Cardoso ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4853810376973
License date	Jun 21, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Antibacterial drug discovery in the resistance era
Licensed Content Author	Eric D. Brown et al
Licensed Content Date	Jan 20, 2016
Type of Use	Thesis/Dissertation

Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de exóticos
Institution name	Escola Universitária Vasco da Gama
Expected presentation date	Jul 2020
Order reference number	Figure 1

Portions	Figure 1: Models of antibiotic drug discovery and development.
Requestor Location	Mr. Sandro Cardoso Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Anseriz, Coimbra 3305-010 Portugal Attn: Mr. Sandro Cardoso
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH
Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

1. 2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

2. 1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

2. 2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

2. 3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to _____ _____ _ __ _____/___ _____ _ __ _____ for these rights.

2. 4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

2. 5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines, as amended from time to time.

3. Duration of Licence

3. 1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months

If you have any questions about this permission request, please contact us at customercare@copyright.com

Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR

ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND
WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. 1. ***BOOKS ONLY:*** Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (_____.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

61

For Journal Content:
Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)

Appendix 1 — Acknowledgements:

For **Advance Online Publication papers:**
Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)

For Adaptations/Translations:
Adapted/Translated by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)

_____ epublication from the British Journal of Cancer, the following edit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: : [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT]** (year of publication)

For **Advance Online Publication** papers:
Reprinted by permission from The [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For Book content:
Reprinted/adapted by permission from [**the Licensor**]: [**Book Publisher** (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [**Book Title**] by [**Book author**(s)] [**COPYRIGHT**] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.2

62

Questions? _____ care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Nature Customer For any r

63

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 21, 2020

This Agreement between Mr. Sandro Cardoso ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4853891456532
License date	Jun 21, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Wiley Books
Licensed Content Title	Concise Review of Veterinary Microbiology, 2nd Edition
Licensed Content Author	B. K. Markey E. S. Fitzpatrick F. C. Leonard P. J. Quinn S. Fanning
Licensed Content Date	Oct 1, 2015

Licensed Content Pages	1
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de exóticos
Institution name	Escola Universitária Vasco da Gama
Expected presentation date	Jul 2020
Order reference number	7

Portions	Modes and sites of action of antibacterial Drugs
Requestor Location	Mr. Sandro Cardoso Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Anseriz, Coimbra 3305-010 Portugal Attn: Mr. Sandro Cardoso
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at _ ___ _____ . _ ____).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

http://myaccount.copyright.com

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license ____ _____iley _____ __ ____ _____ . _____ This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner.**For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding

Materials for the Purpose specified in the licensing process.

("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to

achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The _____ _____ allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The _____ _____-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

71

about.wiley

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 21, 2020

This Agreement between Mr. Sandro Cardoso ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4853850321057
License date	Jun 21, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochemical Pharmacology
Licensed Content Title	Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps
Licensed Content Author	Çiğdem Yılmaz,Gülay Özcengiz
Licensed Content Date	Jun 1, 2017

72

Licensed Content Volume	133
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	20
Start Page	43
End Page	62
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Estudo epidemiológico da prevalência de resistências aos antibióticos no âmbito da clínica de exóticos

73

Institution name	Escola Universitária Vasco da Gama
Expected presentation date	Jul 2020
Order reference number	Figure 3
Portions	Fig. 3. Five main MDEPs with their well-known examples and antibiotic substrates.
Requestor Location	Mr. Sandro Cardoso Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Rua Adelino de Campos Abranches 4 Quinta Anseriz, Coimbra 3305-010 Portugal Attn: Mr. Sandro Cardoso
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at __ ___ _____ . __ _____).

GENERAL TERMS

http://myaccount.copyright.com
21/07/2020

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at _____ _____.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event

permissions@elsevier
21/05/2024

that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world __ ___ rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at __ _____.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at __ _____.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at __ _____.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of

English http://www

articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
    - via their non-commercial person homepage or blog
    - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
    - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
    - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
    - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
    - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
    - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all

value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

_____ _____ If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

_____ _____ May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a _____ _, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's ____ . ___ . for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Gold Open Access Articles:

erms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at g/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at g/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at __ _____ g/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.9

Questions? _____ care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

81

http://creativecommons.or customer