

Centro Universitário de Lisboa

Unidade Orgânica

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**BACTÉRIAS ZOONÓTICAS EM DRAGÕES
BARBUDOS (*POGONA VITTICEPS*) SAUDÁVEIS:
UMA ABORDAGEM *ONE-HEALTH***

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre
em Medicina Veterinária, orientada pela Professora Doutora Adriana Belas e Professor
Doutor Rui Patrício

Joaquim Smolders Cesário, nº 21703259

2024

Centro Universitário de Lisboa

Unidade Orgânica

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**BACTÉRIAS ZOONÓTICAS EM DRAGÕES
BARBUDOS (*POGONA VITTICEPS*) SAUDÁVEIS:
UMA ABORDAGEM *ONE-HEALTH***

Versão Final

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona,
Centro Universitário de Lisboa no dia 25/1/2024, perante o júri,
nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º:74/2006, de 24 de março,
com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Cátia Marques

Arguente: Professora Doutora Andreia Valença (Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa)

Orientador: Professora Doutora Adriana Belas

Este trabalho também foi orientado pelo Professor Doutor Rui Patrício

Joaquim Smolders Cesário, nº 21703259

2024

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, pelos seus docentes dedicados e aprendizagem proporcionada que me permitiu realizar o sonho de ser Médico Veterinário.

À minha orientadora, Professora Doutora Adriana Belas, pelo seu apoio e ajuda, paciência e orientação durante a realização da dissertação, partilhando todos os seus conhecimentos comigo.

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Rui Patrício, pela ajuda e apoio durante todo o curso e durante o meu estágio realizado na Clínica All Pets Tires, onde tive oportunidade de aprender muito, estando sempre disponível para mim.

À equipa de veterinários, Dra. Graça Oliveira, Dra. Isabel Pereira e a todo o *staff* de tratadores do Badoca Safari Park, com especial menção ao Tomás, ao Marcos, à Joana Rações e à Joana Esteves, por toda a ajuda e partilha de conhecimento que adquiri sobre o nosso amor comum, os animais selvagens, durante 4 meses.

Aos meus amigos que conheci durante o curso, que sem dúvida me ajudaram bastante em vários momentos, criámos várias memórias que nenhum de nós se esquecerá e isso é o que fica para sempre. Em especial ao meu querido amigo Gonçalo que fez com que o curso fosse mais leve e “fácil”, tornando-se num irmão para mim.

A toda a minha família, em especial os meus pais, que me proporcionaram esta etapa na minha vida, dando-me sempre força para seguir os meus objetivos, sempre me ensinando a ser uma melhor pessoa durante toda a minha vida. Agradeço-lhes tudo o que fizeram e o que fazem por mim.

Resumo

A flora oral e cloacal dos répteis está associada à presença de bactérias patogênicas oportunistas e zoonóticas. Com o aumento de répteis como animais de estimação, em especial, o dragão barbudo (*Pogona vitticeps*), sendo o réptil mais popular do mercado, ocorre também o aumento da possibilidade de transmissão de doenças para o ser humano através do contato, com especial atenção às bactérias multirresistentes.

Pretendeu-se, com este estudo, identificar possíveis bactérias zoonóticas como *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração da cavidade oral e cloacal dos dragões barbudos saudáveis através de amostras obtidas por zaragatoas estéreis.

Neste estudo foram identificadas um total de sete espécies de bactérias, tais como, *Salmonella enterica enterica* ser. *pomona*, *Salmonella enterica diarizonae*, *Salmonella enterica enterica* ser. *kentucky*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. e duas bactérias multirresistentes como *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*.

O presente estudo evidenciou informação crucial a respeito da microbiota de dragões barbudos, revelando a presença significativa de bactérias potencialmente zoonóticas, com especial atenção às bactérias multirresistentes. O resultado ressalta a importância de uma abordagem cautelosa por parte dos tutores. A coexistência de bactérias com potencial zoonótico sugere que a interação próxima com dragões barbudos pode representar um risco para a saúde humana, especialmente quando se considera a resistência antimicrobiana, uma preocupação crescente na saúde pública.

Palavras-chave: *Pogona vitticeps*, bactérias multirresistentes, zoonóticas, flora oral, flora cloacal

Abstract

The oral and cloacal flora of reptiles is associated with the presence of opportunistic pathogenic and zoonotic bacteria. With the increasing popularity of reptiles as pets, particularly the bearded dragon (*Pogona vitticeps*), which is the most popular reptile in the market, there is also an increase in the possibility of disease transmission to humans through contact, with special attention to multidrug-resistant bacteria.

This study aimed to identify potential zoonotic bacteria such as *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., and bacteria resistant to third generation cephalosporins from the oral and cloacal cavities of healthy bearded dragons through samples taken with sterile swabs.

In the study, a total of seven bacterial species were identified, including *Salmonella enterica enterica* ser. *pomona*, *Salmonella enterica diarizonae*, *Salmonella enterica enterica* ser. *kentucky*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., and two multidrug-resistant bacteria, *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*.

This study has provided crucial information about the microbiota of bearded dragons, revealing the significant presence of potentially zoonotic bacteria, with particular attention to multidrug-resistant bacteria. The findings underscore the importance of a cautious approach by caretakers. The coexistence of bacteria with zoonotic potential suggests that close interaction with bearded dragons may pose a risk to human health, especially considering antimicrobial resistance, a growing concern in public health.

Keywords: *Pogona vitticeps*, multidrug-resistant bacteria, zoonotic, oral flora, cloacal flora

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AmpC – do inglês “Ampicilina Class C beta-lactamases”

AK- Amicacina

AMC- Amoxicilina/ácido clavulânico

bla – beta-lactamase

CAZ- Ceftazidima

C3G – cefalosporinas de 3º geração

CIP- Ciprofloxacina

CN- Gentamicina

CTX- Cefotaxima

CTX-M – cefotaximase

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

DOX- Doxiciclina

ENR-Enrofloxacin

ESBL – do inglês “Extended-spectrum beta-lactamases”

EWS – do inglês “European Wildlife Service”

ET AL. – E outros, da locução latina “et ali”

F- Nitrofurantoína

FEP-Cefepime

FOX- Cefoxitina

h- horas

LEV- Levofloxacin

MBD – do inglês “Metabolic bone disease”

MDR – multirresistente, do inglês “multidrug resistance”

mL – mililitros

µg – micrograma

µL – microlitros

µM – micromolar

NA- Ácido nalidíxico

n – número

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polimerase Chain Reaction”

Pb – pares de base

PRL- Piperacilina

Ser. – serotipo

SHV – do inglês “sulf-hydryl variable active site”

spp. – espécies, da locução latina “species pluralis”

TEM – Temoniera

TBE - tampão tris-borato-EDTA

TSA – teste de sensibilidade a antibióticos

TZP- Piperacilina/tazobactam

UV – ultravioleta

WGS- do inglês “Whole Genome Sequence”

WNV – do inglês “West Nile Virus”

Índice

Índice de tabelas-----	8
Índice de Figuras -----	9
Capítulo I – Casuística de estágio-----	10
Capítulo II – Introdução-----	14
1. Répteis como animais de estimação-----	14
1.1 Flora bacteriana em répteis-----	17
1.1.1 Importância da caracterização da flora residente-----	17
1.2 Agentes patogénicos bacterianos transmissíveis aos seres humanos através do contato com répteis-----	19
1.2.1 <i>Salmonella</i> spp.-----	19
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> -----	20
1.2.3 <i>Klebsiella</i> spp.-----	20
1.2.4 <i>Proteus</i> spp.-----	20
1.2.5 <i>Aeromonas</i> spp.-----	21
1.2.6 <i>Pseudomonas</i> spp.-----	21
1.2.7 Outros agentes patogénicos-----	22
1.3 Antibioterapia em répteis-----	22
1.3.1 Resistência a antibióticos-----	23
2 Dragão barbudo (<i>Pogona vitticeps</i>)-----	25
2.1 Dragões barbudos em estado selvagem-----	25
2.2 Dragões barbudos em cativeiro-----	25
2.2.1 Reprodução em dragões barbudos-----	26
2.2.2 Recomendações para o habitat em cativeiro-----	27
2.2.2.1 Tamanho e materiais do terrário-----	27
2.2.2.2 Distribuição dos animais-----	28
2.2.2.3 Temperatura e iluminação-----	28
2.2.3 Dieta dos dragões barbudos-----	29
2.3 Anatomia da cavidade oral e doença periodontal-----	30
3 Objetivos-----	31
Capítulo III - Material e métodos-----	32
4.1 Amostragem do estudo-----	32
4.2 Isolamento e identificação de bactérias Gram-negativas-----	32
4.3 Extração de DNA-----	33

4.4	Reação em cadeia de polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose	33
4.5	Confirmação da espécie <i>Pseudomonas</i> spp.	33
4.6	Confirmação dos géneros e espécies de Enterobacterales dos isolados suspeitos	34
4.6.1	Confirmação da espécie <i>Escherichia coli</i> e classificação filogenética	34
4.7	Confirmação de género <i>Salmonella</i> spp. por PCR	36
4.7.1	Serotipificação – <i>Salmonella</i> spp.	37
4.8	Identificação de outras espécies de Enterobacterales	37
4.9	Teste de sensibilidade a antibióticos (TSA)	37
4.10	Pesquisa e deteção de genes de resistência aos β -lactâmicos	39
4.10.1	Deteção de genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs)	39
4.10.2	Deteção de genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC	40
Capítulo IV - Resultados		42
Capítulo V - Discussão		49
Capítulo VI - Conclusão		55
7.	Bibliografia	56

Índice de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de <i>Pseudomonas</i> spp e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . -----	34
Tabela 2: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de <i>Escherichia coli</i> e classificação filogenética-----	35
Tabela 3: Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de <i>Salmonella</i> spp. -----	37
Tabela 4: Tabela 4 - Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) nos isolados de <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella aerogenes</i> . -----	40
Tabela 5: Tabela 5 - Oligonucleótidos iniciadores utilizados na técnica de PCR para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC nos isolados de <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella aerogenes</i> -----	41
Tabela 6: Sensibilidade para os isolados de <i>Salmonella</i> spp. nos dragões barbudos nas amostras da cavidade oral e cloaca-----	44
Tabela 7: Enterobacterales produtoras de ESBLs/AmpC nos isolados de dragões barbudos-----	46
Tabela 8: Pseudomonadales nas amostras isoladas dos dragões barbudos e perfil de resistências aos antibióticos-----	47

Índice de Figuras

Figura 1: Casuística de animais acompanhados durante o estágio no Badoca Safari Park-----	10
Figura 2: Procedimentos veterinários efetuados durante o estágio no Badoca Safari Park-----	11
Figura 3: Casuística de animais acompanhados em consulta durante o estágio no All Pets Tires-----	11
Figura 4: Casuística de aves observada durante o estágio no All Pets Tires-----	12
Figura 5: Casuística de mamíferos observada durante o estágio no All Pets Tires-----	12
Figura 6: Casuística de répteis observada durante o estágio no All Pets Tires-----	13
Figura 7: Répteis mais populares no comércio-----	15
Figura 8: Os 10 répteis mais pesquisados no Google-----	16
Figura 9: Poros femorais de um dragão barbudo macho-----	26
Figura 10: Dragão barbudo sob lâmpada para aquecimento-----	28
Figura 11: Árvore dicotômica para determinação do grupo filogenética de estirpes de <i>E. coli</i> -----	35
Figura 12: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para <i>Salmonella</i> spp.-----	42
Figura 13: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para <i>Salmonella</i> spp. na cavidade oral e na cloaca-----	43
Figura 14: Representação gráfica dos resultados dos serotipos de <i>Salmonella</i> spp. obtidos nas diferentes amostras dos dragões barbudos-----	43
Figura 15: Representação gráfica da frequência relativa de Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de terceira geração nos dragões barbudos-----	45
Figura 16: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para Pseudomonadales-----	47

Capítulo I - Casuística de estágio

O autor realizou o estágio curricular de Medicina Veterinária entre setembro 2022 e janeiro de 2023 no Badoca Safari Park com a equipa da *European Wildlife Service* (EWS), que presta serviços tanto no jardim zoológico como em propriedades privadas. A equipa desta empresa era constituída pela Dra. Graça Oliveira e pela Dra. Maria Isabel Pereira. Durante o estágio, foi possível acompanhar as duas médicas veterinárias de forma a aprofundar o conhecimento sobre a medicina selvagem e de que forma a medicina pode ajudar os animais no Zoo. As áreas em maior evidência na medicina de animais de zoo no Badoca Safari Park são a anestesiologia, profilaxia, exames coprológicos e o tratamento de feridas por trauma. Durante o estágio, foi possível ter contato e acompanhar mamíferos, aves e répteis (Figura 1).

Durante o estágio foi possível assistir a intervenções cirúrgicas, vacinações e desparasitações como forma de profilaxia, monitorização e manutenção de anestésias, administração de fármacos, realização de necrópsias, recolha de sangue, observação de crias recém-nascidas e a sua adaptação ao meio envolvente, entre outras atividades (Figura 2).

Além do acompanhamento da equipa de médicos veterinários, também foi possível o acompanhamento dos tratadores de animais do parque, de forma a conhecer melhor a alimentação de cada animal, o comportamento de cada espécie e de cada animal individualmente, treinos e enriquecimentos ambientais.

Animais acompanhados

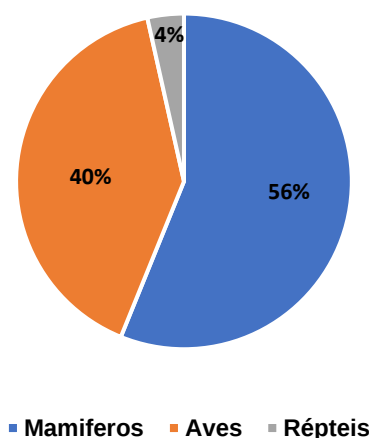


Figura 1. Representação gráfica da casuística de animais acompanhados durante o estágio no Badoca Safari Park

Procedimentos Veterinários

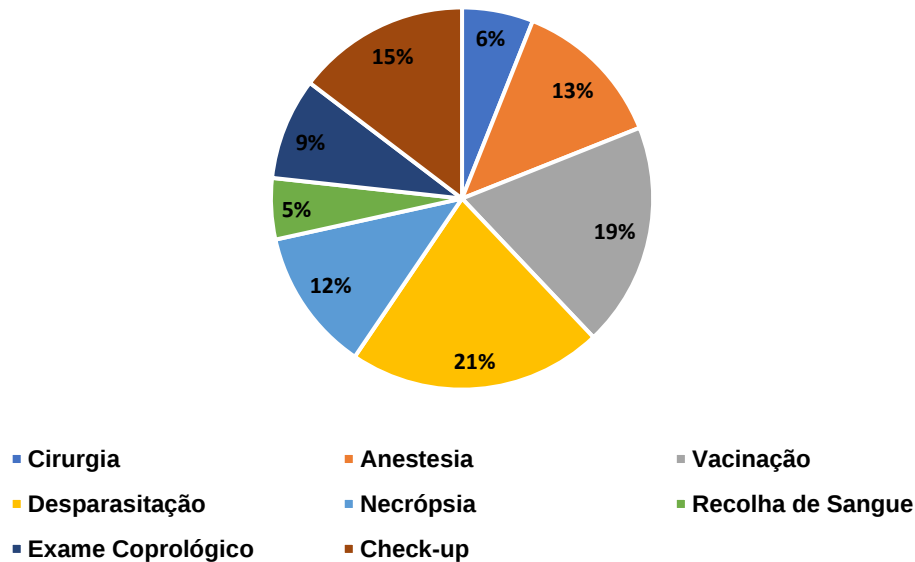


Figura 2. Representação gráfica dos procedimentos veterinários efetuados durante o estágio no Badoca Safari Park

O autor realizou outro estágio curricular, no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, realizado entre março de 2023 e junho de 2023 na clínica veterinária All Pets Tires, sob orientação do Dr. Rui Patrício. Durante o período de estágio, realizou-se a observação e acompanhamento das consultas do Dr. Rui Patrício de diferentes espécies como mamíferos exóticos, aves, répteis e esporadicamente cão e gato (Figuras 3-6), assim como, em outras áreas como anestesia e cirurgia. Foi possível auxiliar o Dr. Rui Patrício nas consultas, processar amostras de sangue no laboratório, realizar a visualização no microscópio de amostras de sangue ou de fezes, caso fosse necessário, administrar vacinas e medicações, auxiliar na preparação cirúrgica e na cirurgia como circulante ou como auxiliar na anestesia e ainda realizar exames completos como radiografia.

Animais em consulta

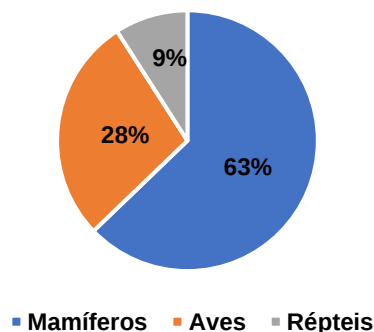


Figura 3. Casuística de animais acompanhados em consulta durante o estágio na clínica All Pets Tires

Casuística de aves

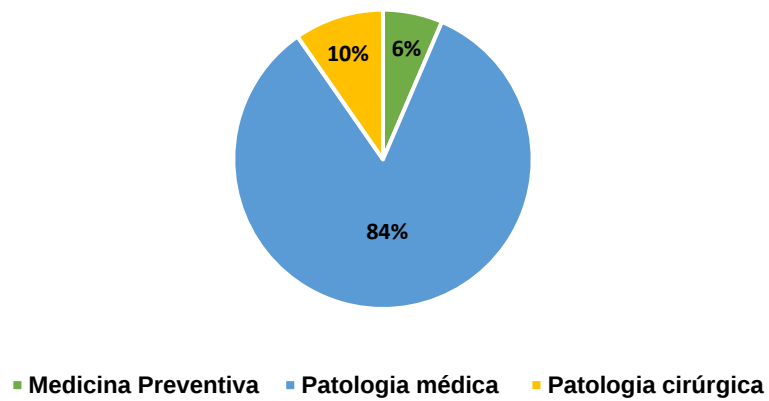


Figura 4. Representação gráfica da casuística de aves observada durante o estágio na clínica All Pets
Tires

Casuística de mamíferos

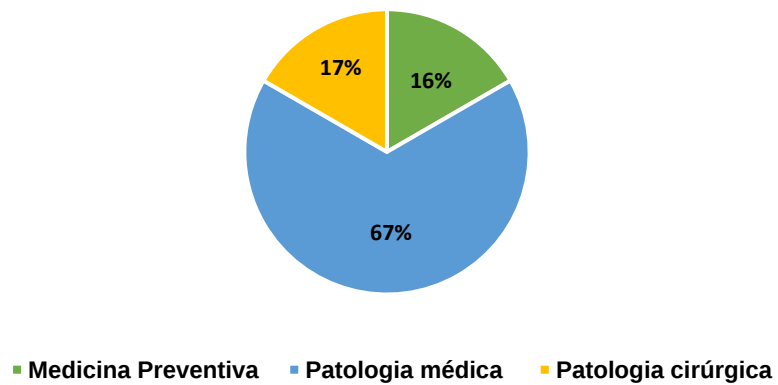


Figura 5. Representação gráfica da casuística de mamíferos observada durante o estágio na clínica All Pets
Tires

Casuística de répteis

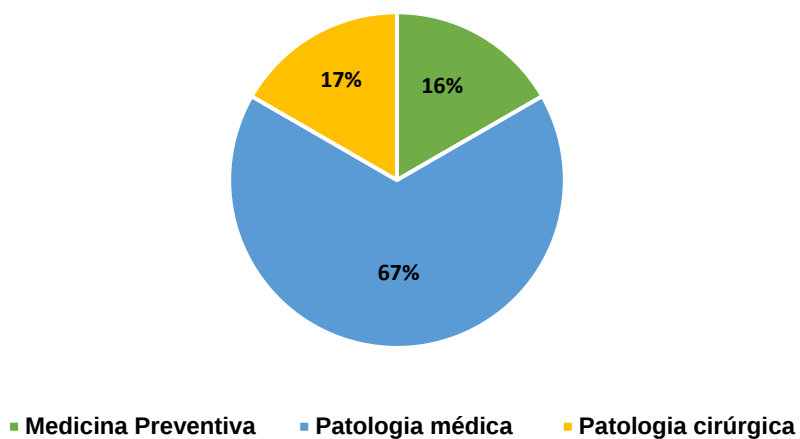


Figura 6. Representação gráfica da casuística de répteis observada durante o estágio na clínica All Pets Tires

Capítulo II - Introdução

Entre as espécies exóticas, os répteis são um grupo popular (Rom et al., 2018). Podem ser obtidos através de criação em cativeiro, mas também podem ser capturados no seu habitat natural. A microbiota dos répteis pode incluir uma variedade de agentes patogénicos, incluindo parasitas e bactérias, trazendo riscos não só para o próprio animal, mas também para os seres humanos e outros animais que entram em contacto com eles (Rás-Noryńska & Sokól, 2015; Ebani, 2017; Rom et al., 2018). Os répteis podem servir de reservatório de bactérias patogénicas e podem transmiti-las por contacto, mordeduras e arranhões (Babalola & Balogun, 2013; Zancolli et al., 2015).

Com o aumento da procura de dragões barbudos (*Pogona vitticeps*) na última década como animais de estimação, há também um aumento do seu contacto com os seres humanos e a possibilidade de transmissão de bactérias com genes de resistência aos antibióticos. Contudo, até à data para nosso conhecimento a informação disponível sobre agentes zoonóticos, patogénicos, bactérias resistentes a antibióticos, especialmente bactérias resistentes às cefalosporinas de terceira geração (C3G) e aos carbapenemos e é limitada nos dragões barbudos (*Pogona vitticeps*). Assim, existe uma forte necessidade em conhecer o papel dos dragões barbudos na disseminação de agentes patogénicos, para uma abordagem *One-Health* de modo a combater a disseminação de agentes zoonóticos e da resistência antimicrobiana.

1. Répteis como animais de estimação

Os répteis como animais de estimação aumentaram significativamente nas últimas duas décadas, com um aumento de 37% nos Estados Unidos de 2006 a 2016 (AVMA Pet Ownership and Demographics Sourcebook, 2017). A popularidade dos répteis como animais de estimação pode ser atribuída à sua natureza relativamente silenciosa e para entretenimento através da observação. Além disso, eles geralmente ocupam menos espaço em comparação com outros animais de estimação, como o cão e o gato (Varela et al., 2022).

No entanto, é importante destacar que os répteis são ectodérmicos e dependem de ambientes com requisitos específicos de iluminação, temperatura e humidade (Varela et al., 2022). Questões como desnutrição, queimaduras térmicas e ingestão de materiais não digeríveis, como substrato, podem levar a uma variedade de problemas de saúde em répteis (Varela et al., 2022).

Além disso, o transporte do criador para o revendedor ou para o proprietário final, pode induzir stress que afeta negativamente a saúde dos répteis. Essas fontes de stress, entre outras, podem aumentar a disseminação de agentes zoonóticos, como a *Salmonella* spp. que nos répteis saudáveis faz parte da flora gastrointestinal (Varela et al., 2022). Este fenómeno representa um desafio significativo para os profissionais de veterinária que trabalham com répteis.

Atualmente um dos répteis mais procurado no mercado de animais de estimação é o dragão-barbudo (Figura 7). Apesar de existirem várias espécies disponíveis para venda, de todas as espécies de origem do deserto australiano, a mais comum é o dragão-barbudo central ou do interior (*Pogona vitticeps*) (Figura 7). Na década de 60 ocorreu a proibição da venda e exportação da fauna selvagem australiana, contudo os exemplares dos dragões barbudos continuaram a ser comercializados por contrabando entre as décadas de 70 e 90 (Valdez, 2021)

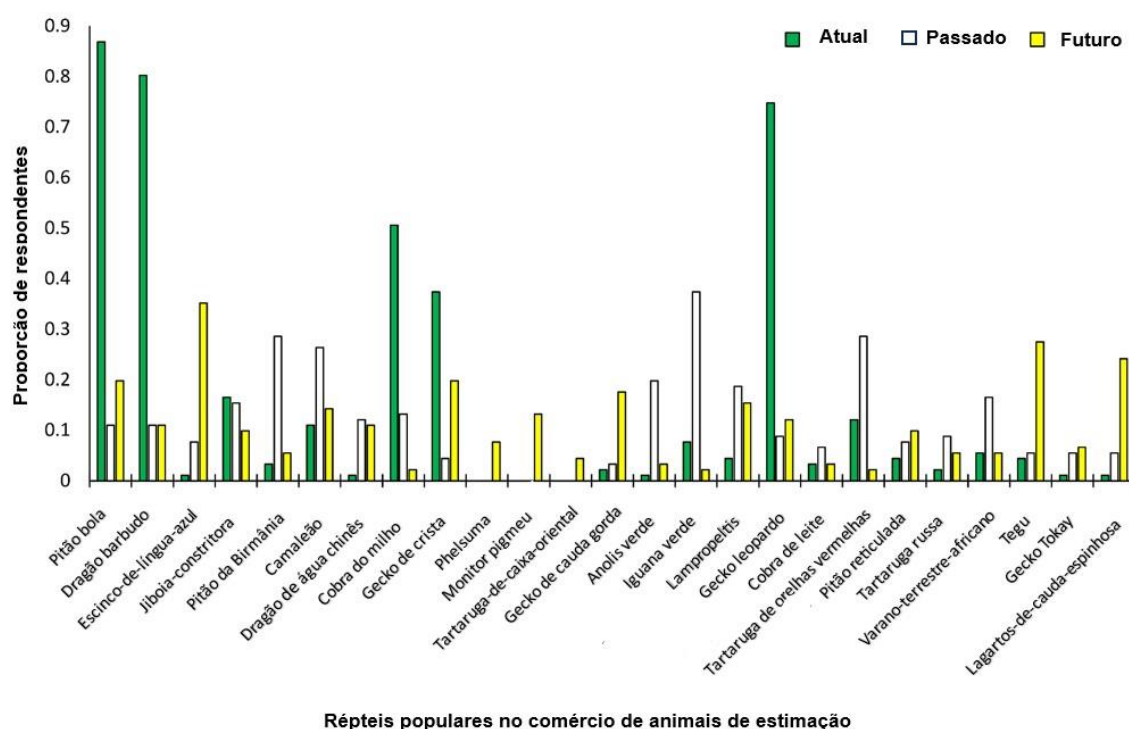


Figura 7 – Répteis mais populares no comércio. (Adaptado de Valdez, 2021).

Segundo um estudo realizado por Valdez (2021), o dragão-barbudo é uma das espécies com mais procura e mais pesquisado entre 2005 e 2020 (Figura 8). O dragão barbudo é uma escolha popular devido à sua aparência atraente, personalidade dócil, tamanho médio e temperamento tranquilo. Além disso, são animais muito atrativos para famílias e crianças, pois são relativamente fáceis de manusear, têm uma dieta omnívora e são relativamente ativos durante o dia. Devido à relativa facilidade de cuidado e décadas de seleção cuidadosa em cativeiro, agora existem diversas variações genéticas disponíveis, como padrões de cores o que aumenta o seu apelo tanto para iniciantes quanto para colecionadores (Valdez, 2021).

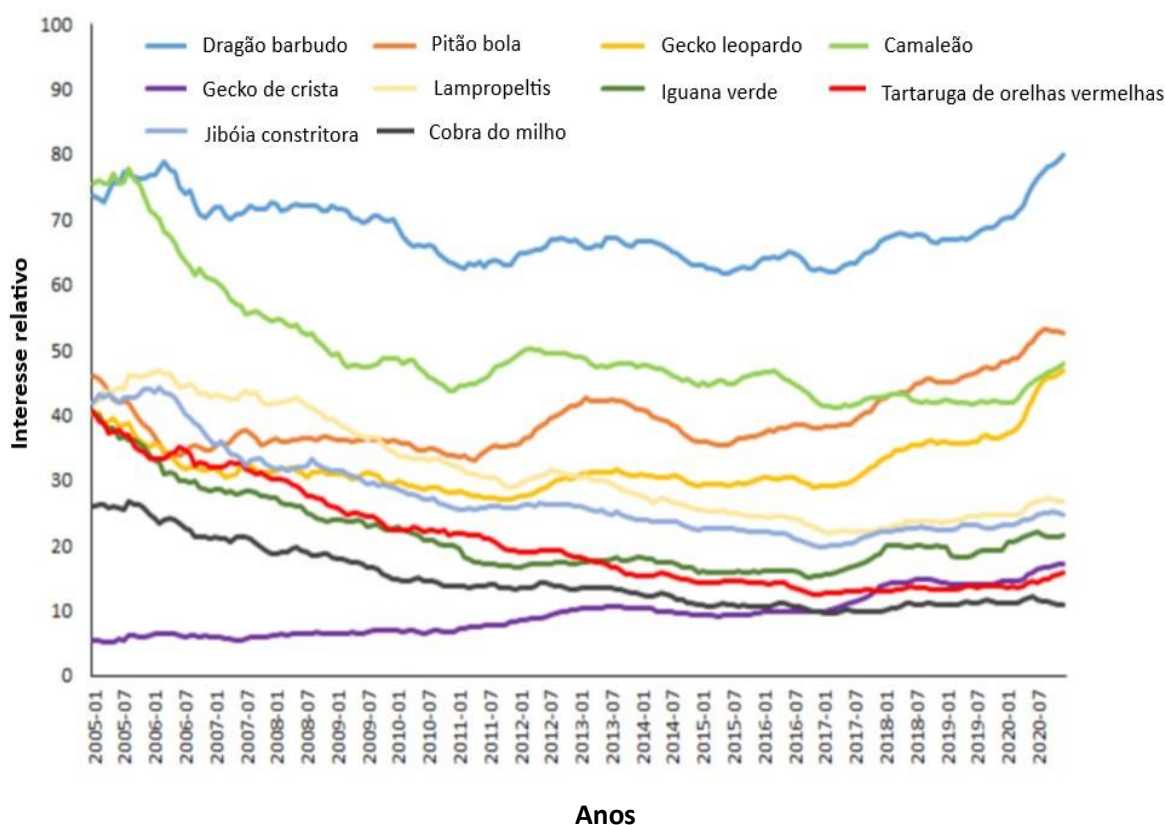


Figura 8 – Os 10 répteis mais pesquisados no Google. (Adaptado de Valdez, 2021).

1.1 Flora bacteriana residente em répteis

Na cavidade oral de répteis, é comum identificar bactérias como, *Pseudomonas* spp, *Serratia* spp., *Aeromonas* spp. e *Providencia* spp., enquanto *Escherichia coli* é frequentemente encontrada no trato intestinal dos répteis, juntamente com espécies de *Pseudomonas* spp. (Hsieh & Babl, 1999; Blaylock, 2001; Dickinson et al., 2001).

A pesquisa da flora bacteriana residente presente na cavidade oral dos répteis pode ser de grande relevância em caso de mordidas, seja entre dois répteis ou entre o seu tutor, uma vez que a composição bacteriana da ferida provavelmente se refletirá da flora oral do animal (Kelsey et al., 1997), o que pode fornecer informações relevantes para o tratamento a seguir. Hsieh e Babl (1999) relataram uma infecção humana por *Serratia marcescens* após uma mordida de réptil.

A microbiota oral residente nos lagartos-de-crista-mexicanos (*Heloderma horridum*) é composta principalmente por *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Enterococcus* spp. (Espinosa-Alives et al., 2008). Por outro lado, em cobras-fita (gênero *Thamnophis*) as bactérias mais encontradas são *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, enquanto cobras chinesas (*Naja atra*) apresentam *Enterococcus faecalis* comumente na cavidade oral. Em outras espécies de ofídios, *Proteus* spp. e *S. maltophilia* são comuns de encontrar (Espinosa-Alives et al., 2008).

A composição da flora oral do predador, como a cobra, é influenciada tanto pela microbiota das presas, como por outros alimentos (Abrahamian & Goldstein, 2011). Essa influência alimentar sugere que a flora bacteriana oral residente das serpentes pode ter origem fecal, sabendo que as presas frequentemente defecam depois de serem ingeridas (Goldstein et al., 1979). As bactérias comumente identificadas na cavidade oral incluem espécies de *Clostridium* spp., Enterobacterales patogênicas e não patogênicas, como *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Escherichia coli* (Goldstein et al., 1981; Blaylock, 2001; Ferreira Junior et al., 2009)

1.1.1 Importância da caracterização da flora residente

De entre as espécies exóticas, os répteis são um grupo popular e em rápido crescimento (Rom, et al., 2018). Podem ser obtidos por meio de reprodução em cativeiro, mas também capturados na natureza.

Os répteis abrigam uma variedade de agentes patogénicos e, considerando os animais capturados na natureza, a sua recolha pode ser imprevisível e desconhecida, trazendo riscos não apenas para o próprio animal, mas também para os seres humanos e outros animais que entram em contato com eles (Rás-Noryńska & Sokół, 2015; Ebani, 2017; Rom et al., 2018). Na verdade, os répteis podem servir como reservatórios de bactérias patogénicas e podem transmiti-las por meio do contato, mordidas e arranhões (Babalola & Balogun, 2013; Zancolli et al., 2015).

Normalmente, as bactérias comensais não provocam doenças em indivíduos saudáveis, mas podem causar infeções graves em hospedeiros com o sistema imunitário comprometido, portanto, é essencial manter cuidados higiénicos no manejo dos animais. Além disso, sabe-se que a flora oral e fecal dos répteis está associada à presença de bactérias patogénicas oportunistas e zoonóticas (Babalola & Balogun, 2013; Zancolli et al., 2015; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015).

Com o aumento da procura por dragões-barbudos, sendo estes dos répteis mais comuns como animais de estimação, também haverá um aumento no contato com seres humanos e na possibilidade de transmissão de bactérias, bactérias resistentes e transferência entre espécies de genes de resistência. No entanto, as informações sobre a flora oral e fecal e de bactérias patogénicas, como bactérias comensais e bactérias multirresistentes (MDR), em dragões-barbudos são escassas.

O aumento da resistência antimicrobiana em animais de estimação representa um desafio na medicina veterinária, pois limita as opções terapêuticas, mas também é um possível veículo para a disseminação de genes de resistência antimicrobiana (Bogaerts et al., 2015). Esse facto deve ser considerado, uma vez que nos últimos anos a demanda por esses animais como animais de estimação aumentou significativamente (Casey et al. 2015).

O uso de antimicrobianos, tanto imprudente quanto indiscriminado, levou ao aumento da resistência antimicrobiana e de bactérias multirresistentes observadas em animais de estimação com diferentes tipos de infeção, bem como ao aumento da colonização de animais de estimação com bactérias multirresistentes após um tratamento clínico bem-sucedido. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a possibilidade de transmissão de algumas bactérias com genes de resistência antimicrobiana entre seres humanos e animais de estimação, e vice-versa (Pomba et al., 2017; One Health Commission, 2018; McEwen & Collignon, 2018; Nigg et al., 2019; Belas et al., 2020). No geral, é necessário realizar mais pesquisas sobre o papel desses animais exóticos na disseminação de agentes patogénicos, incluindo bactérias multirresistentes, de modo a

adotar uma abordagem de *One Health* no combate à disseminação da resistência antimicrobiana.

1.2 Agentes patogénicos bacterianos transmissíveis aos seres humanos através do contato com répteis

1.2.1 *Salmonella* spp.

A doença zoonótica mais prevalente transmitida por répteis de estimação é a salmonelose (Bosch et al., 2016). *Salmonella* spp. pode residir no trato gastrointestinal dos répteis e, em geral, não costuma manifestar sinais de doença nos próprios répteis (Bosch et al., 2016; Schlossberg, 2016). Os répteis têm a capacidade de eliminar intermitentemente as bactérias do género *Salmonella* nas suas fezes (Goupil et al., 2012).

Salmonella spp. é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa que pertence à família enterobacterales tendo estas a forma de bastonetes (bacilos) (Mitchell & Shane, 2001). Os répteis são um reservatório de uma grande variedade de espécies de *Salmonella* spp. Está presente no trato gastrointestinal de tartarugas, cobras e lagartos saudáveis, no entanto podem excretar a bactéria se forem expostos a situações de stress (Austin & Wilkins, 1998).

A transmissão para humanos dá-se mediante a via fecal-oral, sendo também frequente a transmissão indireta por meio da manipulação de objetos que tenham entrado em contato com contaminação (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015). É importante ter precaução no uso de antibióticos para tratar infeções bacterianas, visto que esses agentes afetam a microbiota intestinal, no qual se engloba também a presença de *Salmonella* spp., e consequentemente podem surgir resistências a antibióticos (Mitchell & Shane, 2001). Répteis infetados por salmonelas geralmente não desenvolvem doença. No entanto, em alguns casos, foram observados septicemia, pneumonia, celomite, abscessos, granuloma, choque hipovolémico, osteomielite e morte (Clancy et al., 2016)

Os répteis podem adquirir estirpes da bactéria de várias maneiras, incluindo a transmissão transovarial (quando as bactérias são transmitidas do réptil para a sua descendência), o contacto direto com outros répteis infetados e pela contaminação do ambiente (Schroter et al., 2006). Serpentes e répteis carnívoros podem adquirir estirpes de *Salmonella* spp. através das fontes alimentares, como animais fornecidos como alimento, quer estejam vivos ou congelados.

1.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo conhecido por ser presença comum e inofensiva em animais e em seres humanos, raramente resultando em doenças. No entanto, esta espécie bacteriana é notavelmente complexa, tendo evoluído para estirpes patogênicas, apresentando uma diversidade considerável nas suas características e comportamentos (Ramos et al., 2020). Em répteis é rotineiramente isolada da cavidade oral de cobras saudáveis, assim como, cobras com estomatite. Muitas vezes é encontrada nas fontes de água dos répteis em cativeiro, no entanto, é difícil de interpretar se a água contaminada infeta os animais ou se os animais quando estiverem contaminam a água (Mehler & Bennett, 2003)

1.2.3 *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. são bactérias Gram-negativas que têm um papel significativo na medicina veterinária. Classificadas como facultativas anaeróbias e oxidase negativas, apresentam características distintas, como serem encapsuladas, não-móveis e terem a capacidade de hidrolisar ureia, fermentar inositol e utilizar citrato. Este gênero de bactérias pode ser encontrado em diversos ambientes, incluindo águas superficiais, esgoto, solo e material vegetal (Songer & Post, 2005). Além disso, foram isoladas no trato gastrointestinal de mamíferos e répteis saudáveis (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2005).

Embora alguns profissionais de saúde animal possam considerar *Klebsiella* spp. parte da flora normal, é fundamental notar que quando isoladas em cultura pura ou em animais clinicamente doentes, essas bactérias devem ser tratadas (Paré et al., 2006). Isso se deve ao fato de que elas têm o potencial de causar diversas infecções, como estomatite e enterite (Diaz-Figueroa & Mitchell, 2006). Essas infecções podem levar a uma série de manifestações clínicas, incluindo febre, neutropenia, petéquias, equimoses, choque e edema pulmonar (Songer & Post, 2005).

1.2.4 *Proteus* spp.

Proteus spp. são microrganismos Gram-negativos, possuem a capacidade de crescer em ambientes com ou sem oxigênio (anaeróbios facultativos), são heterotróficos, e têm a capacidade de decompor proteínas. Estes microrganismos têm a potencialidade de causar infecções em humanos, especialmente em indivíduos com sistemas imunitários comprometidos, sendo considerados agentes patogênicos oportunistas (Drzewiecka, 2016).

Animais selvagens e domésticos (incluindo mamíferos, aves, répteis, anfíbios, insetos) servem como hospedeiros de *Proteus* spp. A natureza exata da relação entre essas

bactérias e seus organismos hospedeiro não é completamente compreendida, sendo que a bactéria pode ser comensal ou não (Drzewiecka, 2016). *Proteus vulgaris* é comumente identificado tanto na cavidade oral quanto na cloaca de anfíbios aquáticos (tritões *Lissotriton vulgaris* e rãs *Pelophylax ridibundus*) e em répteis (tartarugas *Mauremys rivulata* e cobras *Natrix natrix*) (Hacioglu & Tosunoglu, 2014).

1.2.5 *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. são bactérias Gram-negativas patogênicas para uma variedade de organismos, incluindo peixes, anfíbios, répteis, cães e humanos. *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa frequentemente encontrada em ambientes aquáticos, sendo comum ser isolada em rios, lagos, água do mar e animais. Em anfíbios, esta bactéria é conhecida por causar a síndrome da perna vermelha, enquanto em répteis e outras espécies de animais pode levar à septicemia. Na medicina veterinária, *Aeromonas* spp. são reconhecidas como agentes etiológicos de diversas doenças, e em humanos, não apenas causam gastroenterite, mas também podem resultar em infecções extraintestinais, como feridas, celulite e septicemia, especialmente em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos. *A. hydrophila* pode ser transmitida de répteis para humanos através do contato físico ou por mordidas quando partilham o mesmo espaço como animais de estimação (Kwon et al., 2019).

1.2.6 *Pseudomonas* spp.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. são bacilos Gram-negativos estando presente no ambiente, atua como um patógeno oportunista tanto para animais como para seres humanos (Foti et al., 2013). Há poucos registros de infecções por *Pseudomonas* spp. em quelônios (Jacobson, 1978; Keymer, 1978), sendo a maioria dos casos documentados em lagartos e serpentes (Jacobson, 1984). Os répteis em cativeiro são reservatórios de *Pseudomonas aeruginosa*, consequentemente são considerados fontes de exposição humana através do contato com fezes, mordidas e arranhões (Foti et al., 2013). As infecções causadas por *Pseudomonas* spp. podem apresentar diversas formas, desde lesões na pele localizadas ou difusas, até lesões orais e linguais, bem como casos de pneumonia e septicemia (Jacobson & Garner, 2021). *Pseudomonas* spp. têm sido associadas a alta morbidade e mortalidade em animais infetados, devido à sua capacidade de desenvolver resistência a antibióticos (Foti et al., 2013).

1.2.7 Outros agentes patogénicos

Para além das bactérias zoonóticas existem outros agentes patogénicos, mas menos frequentes, que podem desencadear infeções em répteis, como: o vírus *do Nilo Ocidental*, *Mycobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Chlamydia* spp., *Burkholderia pseudomallei* (Ebani et al., 2008).

Além disso, foi observado que alguns répteis atuam como hospedeiros amplificadores para determinados arbovírus, incluindo o vírus chikungunya (Bosco-Lauth et al., 2018), West Nile Virus nos crocodilos (Steinman et al., 2003) e o vírus da encefalite equina oriental nas serpentes (White, 2011).

Adicionalmente, répteis importados podem transportar carraças que podem ser portadoras de doenças que afetam seres humanos. Por exemplo, quatro espécies de carraças do género *Amblyomma* que parasitam lagartos e tartarugas foram introduzidas na Flórida e foram encontradas infetadas com *Ehrlichia ruminantium*, causadora da doença "Heartwater" e *Coxiella burnetti*, o agente causador da febre Q (Mendoza-Roldan et al., 2020).

1.3 Antibioterapia em Répteis

As doenças infecciosas, frequentemente desencadeadas por agentes oportunistas, tendem a afetar hospedeiros imunossuprimidos e são as principais causas de doenças e mortalidade (Stewart, 1990; Wheeler et al., 2012) portanto, a terapia antimicrobiana é um elemento essencial no tratamento médico de répteis afetados por infeções bacterianas ou fúngicas (Lawrence, 1983; Philips, 1986). No entanto, escolher o agente terapêutico perfeito em répteis é mais complexo do que em mamíferos devido à variedade de características distintas: anatómicas, fisiológicas e comportamentais (Philips, 1986). As informações sobre a eficácia de agentes antimicrobianos em répteis continuam limitados, embora haja estudos sobre a eficácia de gentamicina (Meredith & Delaney-Johnson, 2010), piperacilina (Beck et al., 1995), carbenicilina (Hilf et al., 1991), ceftazidima (Holz et al., 2002) e enrofloxacin (Lawrence et al., 1984; Prezant et al., 1994).

Geralmente, as dosagens fornecidas são extrapoladas da medicina humana ou da medicina veterinária dos animais convencionais. Uma das razões pode ser a falta de um antibiótico ou classe de antibióticos adequada para a patologia específica dos répteis, o que pode frequentemente resultar em uso inadequado de outra classe por longos períodos (Lawrence, 1983; Philips, 1986).

Nos répteis, as bactérias comuns, como mencionado anteriormente, são consideradas comensais, as infecções geralmente envolvem bactérias Gram-negativas (Raphael et al., 1994; Chung et al., 2017).

O conhecimento sobre resistência a antibióticos é importante para a prevenção e controle de doenças, e, nesse sentido, as espécies de répteis ilustram tópicos relevantes na medicina de animais exóticos, uma vez que diversas bactérias encontradas em répteis têm repercussões zoonóticas (Ogunleye & Carlson, 2017).

1.3.1 Resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos representa uma ameaça global à saúde pública, dificultando aos profissionais, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, o tratamento eficaz de infecções bacterianas (McEwen & Collignon, 2018).

As β -lactamases são as enzimas de maior preocupação em bactérias Gram-negativas, e entre essas, as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), as β -lactamases da classe C (AmpC) e as carbapenemases. Essas enzimas possibilitam que as bactérias resistam aos principais tratamentos terapêuticos disponíveis em contextos clínicos que envolvam antibióticos beta-lactâmicos.

As ESBLs têm a capacidade de hidrolisar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e outros β -lactâmicos, exceto cefamicinas e carbapenemos. Estes últimos só podem ser bloqueados por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (Lee et al., 2011). Marioritariamente, as ESBLs são produzidas por *Klebsiella* spp. e *E. coli*, mas também podem ser encontradas em outras bactérias gram-negativas como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp. e *Pseudomonas* spp. (Grover et al., 2013). Além disso, as bactérias que produzem ESBLs frequentemente também são resistentes a outras classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas (Rawat & Nair, 2010).

Similarmente às ESBLs, as β -lactamases da classe C (AmpC) são de elevada importância clínica, uma vez que as bactérias que as possuem são resistentes a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e monobactâmicos (Bush & Jacoby, 2010). A β -lactamase AmpC pode ser mediada cromossomicamente ou por plasmídeos. As variantes cromossômicas da β -lactamase AmpC são encontradas em bactérias como *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp. As variantes mediadas por

plasmídeos são comuns em *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii* e *Proteus mirabilis* (Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009).

Uma questão crucial é que as bactérias gram-negativas produtoras de AmpC servem como um reservatório oculto para as ESBLs. Por conseguinte, a coexistência dessas enzimas torna o tratamento das bactérias gram-negativas mais complexo, pois as β -lactamases AmpC podem esconder a identificação das ESBLs (Rao et al., 2018).

As carbapenemases emergem como enzimas β -lactamases, cuja codificação pode ocorrer tanto em genes cromossômicos quanto em genes mediados por plasmídeos (Halat & Moubareck, 2020). Estas enzimas destacam-se como as β -lactamases mais potentes, pois demonstram capacidade em hidrolisar uma vasta gama de β -lactâmicos, incluindo carbapenemos, cefalosporinas, penicilina e aztreonam (Halat & Moubareck, 2020).

As Enterobacterales, produtoras destas enzimas, têm sido alvo de um foco de investigação intensivo desde o seu primeiro registo no início da década de 1990 (Yang et al., 1990). Atualmente, há uma crescente conscientização sobre o impacto das bactérias não fermentativas, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como outras bactérias Gram-negativas que produzem carbapenemases, bem como outras bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli* (Halat & Moubareck, 2020). Os principais desafios relacionados à produção de carbapenemases são de natureza clínica, devido à comprometimento da eficácia dos antibióticos de último recurso usados para tratar infecções graves, e epidemiológica, devido à disseminação dessas enzimas em várias bactérias em praticamente todas as regiões geográficas (Halat & Moubareck, 2020).

Num estudo realizado por Cristina e colaboradores (2022) foi demonstrado que as bactérias isoladas dos répteis no estudo exibiram diferentes graus de resistência à maioria dos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas (cefalexina, cefuroxima e cefquinoma), macrolídeos (eritromicina), lincosamidas, penicilinas (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina), florfenicol, tetraciclina (tetraciclina e doxiciclina) e aminoglicosídeos (gentamicina). A resistência foi relatada com menos frequência para cloranfenicol, sulfonamidas e quinolonas (Cristina et al., 2022)

2. Dragões barbudos (*Pogona vitticeps*)

Os dragões barbudos pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Reptilia, ordem Squamata, Família Agamidae, género *Pogona* e espécie *Pogona vitticeps* (Barten & Simpson, 2019).

2.1. Dragões barbudos em estado selvagem

Os dragões barbudos são nativos do Este e do centro da Austrália. Podem ser encontrados em diferentes tipos de habitats, tais como desertos semiáridos e florestas secas. São diurnos, ou seja, são bastante mais ativos durante o dia. (Doneley, 2006)

A sua alimentação consiste tanto em insetos, pequenos lagartos como ervas, frutas e flores (Doneley, 2006).

De acordo com alguns estudos, temperatura corporal ideal de um dragão barbudo é de 35°C e faz com que o seu metabolismo funcione de maneira ideal, no entanto, apenas ocasionalmente se alcança essa temperatura no seu habitat natural, o que os obrigou a adaptar para acomodar essa necessidade fisiológica apanhando banhos de sol e absorvendo calor de superfícies aquecidas (Doneley, 2006).

É um réptil territorial, sendo a hierarquia determinada através do tamanho do corpo. Quando se sentem ameaçados, adotam uma postura defensiva achatando o seu corpo, abrindo a boca e eriçando os seus espinhos na zona do pescoço para parecerem maiores (Doneley, 2006).

Os dragões barbudos atingem a maturidade sexual com um a dois anos, quando estes tiverem um comprimento de adulto, sendo a estação reprodutiva nos meses de calor (setembro a março) na Austrália. As fêmeas escavam buracos para colocar os seus catorze a vinte seis ovos. Por norma, os ovos eclodem 50-70 dias depois da postura, mas dependem das temperaturas ambientais que devem rondar os 29°C (Doneley, 2006).

2.2 Dragões barbudos em cativeiro

A expectativa de vida útil de um dragão barbudo comum (*Pogona vitticeps*) varia entre de 7 a 12 anos. Vários fatores podem influenciar a longevidade do animal como, alimentação equilibrada, boas condições de temperatura e humidade e acesso a cuidados veterinários quando for necessário (Kubiak, 2021). O comprimento de um dragão barbudo, incluindo a cauda, geralmente varia entre 45 e 60 centímetros. Os machos tendem a ser um pouco maiores do que as fêmeas, apresentando dimorfismo sexual neste aspeto, enquanto o peso varia, em média, entre 230 e 520 gramas (Kubiak, 2021). A presença visível de poros femorais ao longo da zona medial dos membros posteriores e o inchaço nos hemipénis na base da cauda são indicativos de um animal macho maduro, embora essas características possam ser

menos evidentes em machos inativos (Figura 9). As fêmeas, por outro lado, terão poros femorais pouco desenvolvidos, uma abertura cloacal menor e uma base de cauda plana (Kubiak, 2021).



Figura 9 – Poros femorais de um dragão barbudo macho. (Barten & Simpson, 2019)

2.2.1 Reprodução dos dragões barbudos

Em cativeiro, os dragões barbudos têm capacidade de se reproduzir durante todo o ano, embora seja necessário um período de diminuição da temperatura do terrário e um aumento da humidade ambiental para estimular o início do período de acasalamento (Kubiak, 2021). As fêmeas recetivas depositam em média de 15 a 25, aproximadamente 2 a 3 semanas após a cópula (Kubiak, 2021).

Além disso, elas podem produzir podem realizar posturas adicionais em intervalos de 4 a 6 semanas, mesmo sem nova cópula, utilizando o esperma retido do acasalamento anterior (Stahl, 1999; Boyer, 2015). Essa capacidade reprodutiva contínua é observada tanto em condições naturais quanto em cativeiro. Os ovos são incubados a uma temperatura de aproximadamente 29°C, num substrato húmido, durante um período de 55 a 75 dias (Stahl, 1999).

A temperatura de incubação desempenha um papel crucial na determinação do sexo das crias. Em condições normais, os embriões com genótipo masculino (ZZ) desenvolvem-se como machos, enquanto os embriões com genótipo feminino (ZW) desenvolvem-se como fêmeas (Ezaz et al., 2005). No entanto, se a temperatura de incubação exceder 32°C, tanto os embriões ZZ quanto os ZW desenvolvem-se fenotipicamente como fêmeas (Deveson et al. 2017). Inicialmente, as crias podem ser criadas todas juntas ou em pequenos grupos, no entanto, é importante observar a presença de diferenças significativas de tamanho, pois os maiores dragões barbudos podem canibalizar os mais pequenos (Raiti, 2012).

2.2.2 Recomendações para o habitat em cativeiro

2.2.2.1 Tamanho e materiais do terrário ‘

Os dragões barbudos são lagartos predominantemente terrestres que ocupam grandes áreas em estado selvagem, sendo estes altamente ativos procurando por alimento, muitas vezes percorrendo mais de 100 metros diariamente (Thompson and Thompson, 2003; Wotherspoon, 2007). No entanto, o tamanho recomendado para os recintos de dragões barbudos em cativeiro é muito menor. As diretrizes sugerem um tamanho mínimo de 183x45 centímetros com uma altura de 60 centímetros (Grenard, 2008) para um único dragão adulto ou um par, ou um espaço mínimo de 183x60 centímetros para um grupo de três a quatro dragões adultos. Esses tamanhos recomendados restringem significativamente os comportamentos naturais e os níveis de atividade dos dragões barbudos (Kubiak, 2021). Portanto, é aconselhável fornecer recintos o mais amplos possível, permitindo espaço suficiente para exercícios e busca por alimento. Terrários de vidro não são adequados para dragões barbudos, pois possuem retenção de calor e ventilação deficientes.(Kubiak, 2021).

Em vez disso, são comumente usados recintos de madeira com várias aberturas para ventilação. É importante incorporar áreas de refúgio com barreiras visuais dentro do terrário. Os dragões barbudos são frequentemente observados a tomar banhos de sol em estruturas verticais, tanto na natureza quanto em cativeiro, portanto, uma combinação de estruturas verticais e horizontais colocadas sob o local de aquecimento (Figura 10) é benéfica para o seu bem-estar (Kubiak, 2021).

Para manter dragões barbudos adultos, é recomendado usar um substrato de areia fina e oferecer alimento em uma tigela ou superfície de pedra para evitar a ingestão do substrato. Pequenas quantidades de areia ingeridas por um lagarto saudável são eliminadas nas fezes sem problemas (Kubiak, 2021). Por outro lado, é importante evitar substratos com partículas grandes, como casca de milho, cascalho ou areias de cálcio que aglomeram, pois há o risco de obstrução intestinal caso seja ingerido (Klaphake, 2010).



Figura 10 – Dragão barbudo sob lâmpada para aquecimento. Foto cedida pelo Professor Dr. Rui Patrício

2.2.2.2 Distribuição dos animais

Não é aconselhável manter vários machos de dragão barbudo juntos, pois pode levar a conflitos entre eles. No entanto, é possível manter fêmeas em pequenos grupos e um único macho pode ser colocado. É importante ressaltar que a reprodução frequente e o comportamento agressivo durante o acasalamento podem causar ferimentos ou debilitação nas fêmeas e agressões podem ocorrer. Sinais como a coloração preta da barba e o movimento da cabeça para cima e para baixo são frequentemente interpretados como exibições de dominância, podendo anteceder comportamentos agressivos ou acasalamento, enquanto o aceno de braços é um sinal de submissão (Boyer, 2015).

Fêmeas juntas com um macho reproduzem-se com facilidade, e mesmo fêmeas sem acesso a um macho podem produzir ovos inférteis. Por isso, é recomendado fornecer uma área com uma camada de areia com uma profundidade entre 15 e 30 centímetros para que elas possam realizar a postura dos ovos (Kubiak, 2021).

2.2.2.3 Temperatura e iluminação

Como é uma espécie diurna que procura o calor, uma fonte de calor suspensa deve ser usada para fornecer um ponto de aquecimento de 35-40°C numa extremidade e criar um gradiente de temperatura de 27-40°C ao longo do terrário. Isso permite que os dragões barbudos escolham áreas no terrário com base nos requisitos de temperatura para condições

fisiológicas no momento. Tamanhos pequenos de habitação não fornecem gradientes de temperatura suficientes (Kubiak, 2021).

Durante a noite, é recomendado reduzir as temperaturas do terrário para cerca de 21°C, a fim de imitar as variações circadianas naturais (Stahl, 1999). Para fornecer suporte térmico sem emitir luz visível, podem ser utilizados um tapete térmico posicionado na lateral do terrário, uma fonte de calor cerâmica ou uma lâmpada infravermelha.

É de extrema importância que os dragões barbudos tenham acesso a uma fonte de luz ultravioleta (UV), pois ela desempenha um papel fundamental na regulação do cálcio no organismo, na promoção da imunocompetência e também é essencial para a visão das cores dos répteis (Raiti, 2012; Baines, 2018). Portanto, a exposição a uma fonte adequada de luz UV é indispensável para o bem-estar desses animais. Durante a muda de pele, é benéfico fornecer um esconderijo húmido (Kubiak, 2012).

2.2.3 Dieta dos dragões barbudos

Dragões barbudos são répteis omnívoros, variando a sua alimentação entre vegetais e insetos, no entanto, ocorre uma mudança ontogenética da dieta, ou seja, a sua alimentação altera-se ao longo da vida (MacMillen et al., 1989).

Os dragões barbudos juvenis são majoritariamente insetívoros e devem ser alimentados com pequenos insetos uma vez por dia. Em estado adulto tornam-se predominantemente herbívoros e devem ser alimentados a cada 1 a 2 dias. Os insetos continuam a fazer parte da dieta dos dragões barbudos adultos, mas em menor quantidade (2-3 vezes por semana) (Doneley, 2006).

Em cativeiro, os vegetais como cenouras, endívias, couve kale, acelgas, brócolos fazem parte da dieta e insetos como grilos, gafanhotos, larvas da farinha e larvas de *Zophoba* também devem ser incluídos (Stahl, 1999).

Os insetos apresentam um baixo teor de cálcio: fósforo e de vitamina D3, o que pode predispor a doenças metabólicas como a doença óssea metabólica (MBD), o que torna necessário misturar na sua alimentação um suplemento de cálcio para garantir o desenvolvimento adequado dos ossos. (Cannon, 2003).

É importante também disponibilizar uma tigela de água ampla e rasa para que os dragões barbudos possam tomar banho e beber água, embora seja raro que eles utilizem essa tigela (Kubiak, 2012).

2.3 Anatomia da cavidade oral e doença periodontal

O dragão barbudo (*Pogona vitticeps*) possui uma dentição acrodonte, isto é, possui uma estrutura dental composta por dentes triangulares compridos que estão diretamente fundidos à mandíbula e à maxila (Mott et al., 2021), formando assim uma unidade funcional única (Dosedelová et al., 2016). Este tipo de dentição também pode ser encontrado em outros répteis como camaleões e tuataras (Kieser et al., 2009; Mans, 2013; Pollock, 2018). Os dentes do dragão barbudo não são substituídos ao longo da sua vida (Cooper, 1970).

Durante o seu desenvolvimento, a polpa dos dentes é substituída por uma matriz mineralizada que funde os dentes ao osso. Conforme o dragão barbudo cresce, os novos dentes vão crescendo caudalmente (Cooper, 1970).

Na dentição acrodonte, o tecido gengival fixa-se mais abaixo nas áreas bucais e linguais na mandíbula e na maxila, ao contrário de outros répteis e mamíferos que se liga na base do dente (Mans, 2013). As faixas expostas do osso mandibular e o osso maxilar são apenas cobertas por uma fina camada de epitélio estratificado (Reusch, 2009; Wilkinson, 2016), o que predispõe a colonização bacteriana (Stahl, 2003).

A doença periodontal é uma condição comumente encontrada em lagartos de dentição acrodonte, como os dragões barbudos (Raftery, 2004; Hedley, 2016).

Em 1994 foi descrito pela primeira vez, o primeiro caso de doença periodontal em dragões barbudos, com sinais clínicos semelhantes aos dos animais de estimação mais comuns, como o cão e o gato (McCracken & Birch, 1994). É caracterizada por uma inflamação progressiva e irreversível do ligamento periodontal e do osso alveolar, levando à perda da sua inserção (Clarke & Camaeron, 1996). Embora a doença periodontal em estágios precoces seja semelhante entre as várias espécies, na dentição acrodonte em estado avançado ocorre osteomielite e necrose óssea, ao invés, de perda dentária. (Simpson, 2015; Pollock, 2018)

É importante ressaltar que o termo “doença periodontal” é frequentemente utilizado para descrever todos os estágios da doença dental em répteis com dentição acrodonte (Mans, 2013), no entanto, estes não possuem um ligamento periodontal (Dosedelová et al., 2016).

Os estágios iniciais da doença periodontal são caracterizados por manchas nos dentes e nos ossos mandibular e maxilar expostos, eritema gengival e acumulação de cálculo dentário (McCracken & Birch, 1994; Boyer, 2015). A doença pode progredir para um maior acúmulo de tártaro, retração gengival e formação de bolsas gengivais, nas quais se podem acumular cálculo bacteriano, restos alimentares e material purulento (Raiti, 2012). O estágio mais avançado da doença é marcado por osteomielite, o que pode resultar em necrose dos

ossos mandibulares e maxilares, fraturas, podendo ainda haver a possibilidade de desenvolvimento de doença sistêmica e septicemia (Stahl, 2003; Raiti, 2012). A doença é frequentemente subclínica, ou seja, assintomática e só detectada durante o exame oral (Hedley, 2016).

As causas exatas da doença periodontal em dragões barbudos são desconhecidas (Mans, 2013), no entanto existem inúmeras sugestões, tais como, traumas na boca (McCracken & Birch, 1994), dieta rica em frutas (Mehler & Bennett, 2005; Raiti, 2012; Mans, 2013; Hedley, 2016), aumento da idade (Mans, 2013), presença de doenças concomitantes ou cuidados inadequados (Reusch, 2009; Mayer & Donnelly, 2013). Todas estas hipóteses estão relacionadas com os animais em cativeiro (Mader & Divers, 2013).

Não há relatos de dragões barbudos selvagens a sofrer de doença periodontal (McCracken & Birch, 1994), o que faz muitos veterinários acreditar que uma dieta mais abrasiva pode ajudar a prevenir a doença (Reusch, 2009), como alimentação com base em térmitas, formigas, gafanhotos, outros artrópodes, assim como matéria vegetal (Oonincx et al., 2015). Acredita-se que alimentos mais duros podem ser benéficos para estimular a mastigação, removendo fisicamente a placa dos dentes e prevenir a invasão bacteriana dos ossos expostos (Mans, 2013)

Tanto agentes patogénicos fúngicos (Heatley et al., 2001) quanto bacterianos (Stahl, 2006) têm sido associados à doença periodontal em animais com dentição acrodonte, sendo as bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas, bactérias anaeróbias, além de espiroquetas são os mais isolados (Reusch, 2009; Colombo et al., 2017). O tratamento inclui analgesia e o uso de antibióticos após cultura e o teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) (Stahl, 2006). A anestesia geral é necessária para o desbridamento das lesões, remoção de tártaro dentário e radiografia do crânio para identificar a presença ou extensão da osteomielite nos ossos maxilares e mandibulares (Hedley 2016).

3. Objetivos

Este estudo teve como objetivo a pesquisa e identificação de bactérias zoonóticas, como *Salmonella* spp., *Pseudomonadales* e *Enterobacterales* resistentes a C3G na flora oral e cloacal de dragões barbudos saudáveis (*Pogona vitticeps*), com uma abordagem *One-Health*, contribuindo para informação de criadores e tutores deste réptil.

4. Material e Métodos

4.1. Amostragem do estudo

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa (processo nº3/2023). O consentimento dos tutores/criadores foi obtido verbalmente.

A amostragem foi realizada em 20 dragões barbudos (*Pogona vitticeps*). A colheita das amostras foi realizada em um ambiente limpo e seguro para evitar qualquer contaminação externa que pudesse comprometer a validade dos resultados. Todas as amostras foram colhidas na zona metropolitana de Lisboa.

Para garantir a integridade dos dados, foi estabelecido um critério rigoroso para a inclusão dos animais no estudo. Cada dragão barbudo participante precisava de estar aparentemente saudável e não ter recebido qualquer forma de antibioterapia nos últimos seis meses a um ano. Esse requisito assegurou que as amostras refletissem com precisão a condição natural dos animais, sem interferências de tratamentos anteriores.

Em cada dragão barbudo selecionado, foram colhidas duas amostras, incluindo uma amostra oral e uma amostra cloacal, usando zaragatoas com meio de amies. Resultando um total de quarenta amostras.

4.2. Isolamento e identificação de bactérias Gram-negativas

Após a chegada das amostras de zaragatoas orais e cloacais ao laboratório, procedeu-se ao isolamento e identificação das bactérias pertencentes às ordens Pseudomonadales e Enterobacterales, seguindo os métodos bacteriológicos padrão do laboratório. Em resumo, as amostras foram semeadas em diferentes meios de cultura, incluindo meio Columbia com 5% de sangue de carneiro (Oxoid, Reino Unido), MacConkey agar (Biokar Diagnostics, França), meio IRIS Salmonella® (Biokar) e UriSelect™4 Medium (Biorad Laboratories, USA). Para detetar Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de terceira geração (C3G) e carbapenemos (CP), as amostras foram semeadas em meio MacConkey agar suplementado com 1,0 µg/mL de cefotaxima (ThermoFisher Scientific, Inglaterra) e 1,5 µg/mL de meropenemo (Tcichemicals, Alemanha), respetivamente. Após 24-48 horas de incubação, foram observados o crescimento de colónias bacterianas não fermentadoras e fermentadoras da lactose. As diferentes colónias obtidas foram isoladas em meio Columbia com 5% de sangue de carneiro (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e submetidas ao teste de oxidase (PanReac AppliChem).

4.3 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada utilizando o método de fervura adaptado de (DTU food Nacional Institute, 2023). Sucintamente, uma suspensão da cultura bacteriana em questão foi preparada em 100 µL de água MilliQ e foi submetida à lise pelo calor, mantendo-a a 100°C durante 15 minutos. O sobrenadante resultante após a centrifugação foi armazenado a -20°C para posterior realização do método de reação em cadeia de polimerase (PCR).

4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e Eletroforese em gel de agarose

PCR é um método amplamente utilizado na biologia molecular moderna e desempenha um papel crucial na pesquisa veterinária. Desenvolvida por Kary Mullis em 1984, essa técnica *in vitro* permite a amplificação precisa de uma molécula alvo de DNA, tornando-a fácil de ser manipulada e analisada por meio de métodos convencionais de biologia molecular (Sárosi et al., 1992; Bermingham & Luetlich, 2003; Patel et al., 2015; Rajalakshmi, 2017)

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica altamente eficaz para separar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, variando de 100 pares de bases (bp) a 25 mil pares de bases (kb) (Sambrook & Russell, 2001).

Os fragmentos de DNA não possuem uma coloração visível, e, portanto, após a conclusão do processo de eletroforese, é necessário utilizar um agente intercalante para identificar onde esses fragmentos se encontram no gel.

4.5 Confirmação do género *Pseudomonas* spp.

Para a identificação e confirmação do género *Pseudomonas* spp. e espécie *aeruginosa*, foi utilizada uma técnica de PCR multiplex adaptada dos protocolos de Spilker et al. (2004) e Padmavathy et al. (2012). O procedimento de PCR foi realizado em um volume final de 25 µL, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 µL de Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 1) e 1,5 µL de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena Alemanha), começando com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (30 segundos a 55°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Controle positivo e um controle negativo foram incluídos em cada reação.

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

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

Após a amplificação do DNA, 5 µL de cada reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYtech) a 1,5% (p/v) em tampão tris-borato-EDTA (TBE) durante 60 minutos a 90V, utilizando uma cuba de eletroforese (VWR). Em cada corrida, foram adicionados 5 µL do marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V 50-1000pb (NZYtech). Os produtos de PCR foram visualizados utilizando um transluminador ultravioleta (UView™ Mini Tansilluminator, Bio-rad).

4.6 Confirmação de géneros e espécies de Enterobacterales dos isolados suspeitos

4.6.1 Confirmação da espécie *Escherichia coli* e classificação filogenética

A confirmação da espécie *E. coli* e classificação quanto ao seu grupo filogenético foi obtida através de um PCR multiplex onde é feita a amplificação do gene *gadA*, o qual é característico desta espécie e através da amplificação de outros dois genes, *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2 (Doumith, et al., 2012) (Figura 11).

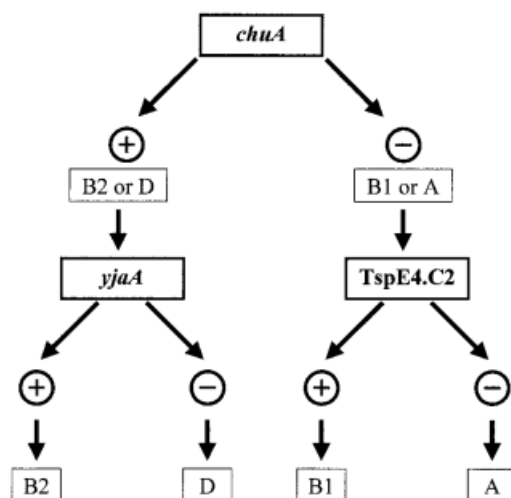


Figura 11: Árvore dicotômica para determinação do grupo filogenético de estirpes de *E. coli* (adaptado de Clermont et al., 2020)

Cada reação de PCR foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 µL de Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 2) e 1,5 µL de DNA alvo. A reação foi realizada em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena), começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (30 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Controlo positivo (estirpe previamente sequenciada) e um controlo negativo (sem DNA) foram incluídos em cada reação. Posteriormente, os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados conforme descrito anteriormente.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de *Escherichia coli* e classificação filogenética.

Gene/fragmento de DNA	Designação do oligonucleotídeo	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referência
Gene - gadA	gadAF	GATGAAATGGCGTTGGCG CAAG	373	Doumith et al. 2012

	gadAR	GGCGGAAGTCCCAGACG ATATCC		
Gene - chuaA	chuaAF	ATGATCATCGCGGCGTGC TG	281	
	chuaAR	AAACGCGCTCGCGCCTAA T		
Gene - YjaA	YjaAF	TGTTGCGGATCTTGAAAG CAAACGT	216	
	YjaAR	ACCTGTGACAAACCGCCC TCA		
Fragmento de DNA - TSPE4.C2	TSPE4.C2F	GCGGGTGAGACAGAAAC GCG	152	
	TSPE4.C2R	TTGTCGTGAGTTGCGAAC CCG		

4.7 Confirmação de género *Salmonella* spp. por PCR

Para confirmar a presença do género *Salmonella* spp., foi aplicado o método de PCR adaptado do estudo de Malorny *et al.* (2003) onde é feita a amplificação do gene *invA*, o qual é característico desta bactéria. O PCR foi realizado num volume final de 25 µL, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 µL de Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 3) e 1,5 µL de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena) começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (60 segundos a 60°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Controlo positivo (estirpe previamente sequenciadas) e um controlo negativo (sem DNA) foram incluídos em cada reação. Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese e visualizados conforme descrito anteriormente.

Tabela 3 - Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para identificação de *Salmonella* spp.

Gene	Designação do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referencia
invA	invAF	GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA	284	Malorny et al. 2003
	invAR	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

4.7.1 Serotipificação - *Salmonella* spp.

Para as amostras que testaram positivo no PCR multiplex para *Salmonella* spp., a serotipificação das colónias suspeitas foi conduzida de acordo com o Esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Grimont & Weill, 2007) através do método de aglutinação. Este processo envolveu o uso de soros comerciais pela Biorad. É importante notar que a serotipificação foi realizada por um laboratório externo.

4.8 Identificação de outras espécies de Enterobacterales

A identificação de outras as espécies de Enterobacterales foi realizada em VITEK® MS (Biomérieux, França) por Laboratório externo.

4.9 Teste de sensibilidade a antibióticos (TSA)

O teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) é um procedimento laboratorial conduzido por profissionais de saúde para determinar qual tratamento antimicrobiano mais adequado e eficaz para cada paciente individualmente. Em uma escala mais ampla, esse teste contribui para a avaliação dos serviços de tratamento oferecidos por hospitais, clínicas e programas nacionais dedicados ao controlo e prevenção de doenças infecciosas (Graham et al., 1985; Sawatzky et al., 2015).

O método de teste de sensibilidade por difusão em disco (Jorgensen & Turnidge, 2007) é simples e eficaz, sendo meticulosamente padronizado. O procedimento envolve a aplicação de uma cultura bacteriana na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Em seguida, discos de papel contendo concentrações fixas de antibióticos, disponíveis comercialmente, são dispostos sobre o ágar inoculado. As placas são incubadas por um período de 16 a 24 horas a 37°C antes de analisar os resultados obtidos. As zonas de inibição

de crescimento ao redor de cada um dos discos de antibiótico são cuidadosamente medidas em milímetros para avaliação (Jorgensen & Ferraro, 2009).

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

Para os isolados confirmados como *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* foram utilizados os seguintes antibióticos: amicacina (30µg), cefepime (30µg), ceftazidima(10 µg), ciprofloxacina(5µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipeneme(10 µg), levofloxacina(5µg), meropeneme(10 µg), piperaciclina(30µg), piperaciclina/tazobactam(30-6µg).

Para os isolados confirmados como *Salmonella* spp. e para as outras Enterobacterales resistentes às C3G foram testados os seguintes antibióticos: amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg), cefotaxima (5 µg), ceftazidima (10 µg), ceftioxima (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazole(1,25/23,75µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), doxiciclina (30µg), minociclina (30µg), cefepime (30µg), ceftazidima(10 µg), ácido nalidixico (30µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipeneme(10 µg), levofloxacina(5µg), meropeneme (10 µg), ertapeneme (10 µg), piperaciclina(30µg) e piperaciclina/tazobactam(30/6µg), Fosfomicina (200 µg), nitrofurantoina (300 µg). Para os isolados de *Salmonella* spp. foi utilizado o disco de pefloxacina (5 µg) em vez de ciprofloxacina (5 µg) e entre as tetraciclina estudadas apenas foi realizado o disco para a tetraciclina e os discos de fosfomicina e nitrofurantoína não foram realizados.

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

Para classificação da bactéria quanto a ser MDR foi utilizada a classificação proposta por Magiorakos e colaboradores (2012).

4.10 Pesquisa e detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos

Para os isolados com resistência às C3G foi pesquisada a presença de ESBL e AmpC. A detecção de genes foi realizada de através diferentes PCRs.

4.10.1 Detecção de genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs)

Para detecção do gene que codificam para a β -lactamase do tipo TEM foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*TEM. Foi realizado um PCR adaptado do protocolo descrito por Caniça e colaboradores (1997). O PCR foi realizado num volume final de 25 μ L, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 μ L de Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 4) e 1,5 μ L de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena), começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (60 segundos a 94°C), hibridação (2 minutos a 56°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para detecção do gene que codificam para a β -lactamase do tipo SHV foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*SHV. Foi realizado um PCR adaptado do protocolo descrito por Rasheed e colaboradores (1997). O PCR foi realizado num volume final de 25 μ L, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 μ L de Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 4) e 1,5 μ L de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena), começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (60 segundos a 54°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo CTX-M foi realizada com a detecção de uma sequência conservada do gene *bla*CTX-M. Foi realizado um PCR adaptado do protocolo descrito por Edelstein e colaboradores (2003). O PCR foi realizado num volume final de 25 μ L, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 μ L de Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 μ M de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 4) e 1,5 μ L de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena), começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação (60 segundos a 94°C), hibridação (2 minutos a 54°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para cada uma das reações descritas anteriormente foram utilizados um controlo positivo e um controlo negativo.

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese e visualizados conforme descrito anteriormente.

Tabela 4 - Oligonucleótidos iniciadores, utilizados na técnica de PCR para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) nos isolados de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes*.

Gene	Designação do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referência
TEM	FIN	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	1091	Caniça et al. 1997
	DEB	ATGAGTAAACTTGGTCTGAC		
SHV	SHVf	CGCTTCTTTACTCGCCTTTA	911	Rasheed et al, 1997
	SHVr	TTAGCGTTGCCAGTGCTC		
CTX-M	CTX-MF	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544	Edelstein et al. 2003
	CTX-MR	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		

4.10.2 Detecção de genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC

A identificação de genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC, foi realizado por PCR multiplex adaptado de Pérez-Pérez e Hanson (2002).

O PCR foi realizado num volume final de 25 μ L, contendo água MilliQ esterilizada, 12,5 μ L de Supreme NZYTaq II 2x Green Master Mix (NZYtech), 0,5 μ M de cada um dos oligonucleótidos (Tabela 5) e 1,5 μ L de DNA alvo. A reação foi conduzida em um termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena), começando com uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 25 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), hibridação (30 segundos a 65°C) e extensão (60 segundos a 72°C), finalizando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Tabela 5 - Oligonucleótidos iniciadores utilizados na técnica de PCR para detecção dos genes que codificam para as β -lactamases do tipo AmpC nos isolados de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes*.

Gene	Designação do oligonucleótido	Sequência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto de PCR (bp)	Referência
ACC	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346	Pérez-Pérez & Hanson (2002)
	ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
LAT-1; -3, BIL-1, CMY-2 to -7, -12 to -18, -21 to -23	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	
	CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
DHA	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405	
	DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
FOX	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190	
	FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
ACT-1; MIR-1	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302	
	EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
MOX; CMY-1, -8, -11; -19	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		

Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o software GraphPad. Para comparação entre as amostras orais e da cloaca em relação à presença *Pseudomonas* spp., e de *Salmonella* spp. O teste Exato de Fisher foi utilizado com um valor de $p \leq 0,05$.

Capítulo IV

5. Resultados

Caracterização da amostra de estudo

A amostra em estudo consistiu em 20 dragões barbudos saudáveis, de ambos os sexos, 7 dos animais eram machos e 8 fêmeas e com idades compreendidas entre 7 e 60 meses. Em 5 dos animais não foi possível saber o sexo e a idade.

Para cada um dos animais foram colhidas duas amostras, uma zaragatoa da cavidade oral e uma zaragatoa cloacal.

Pesquisa de *Salmonella* spp. em dragões barbudos.

Neste estudo, 25% (n=5/20) dos animais foram positivos para *Salmonella* spp. (Figura 12), nas amostras da cloaca. Em um dos animais (n=1/20) foi detetada *salmonella* spp. na cavidade oral para além de ter sido detetada na cloaca (Figura 13).

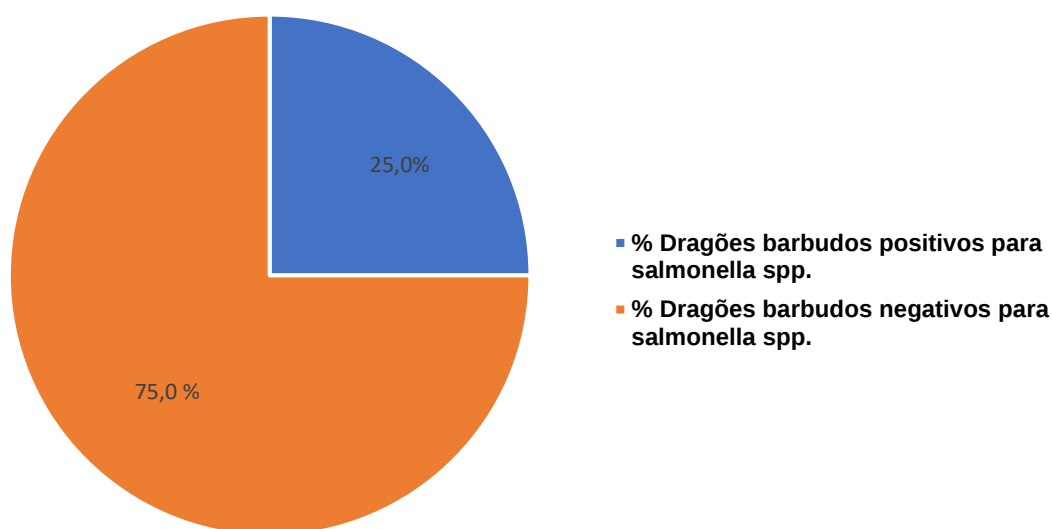


Figura 12: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para *Salmonella* spp.

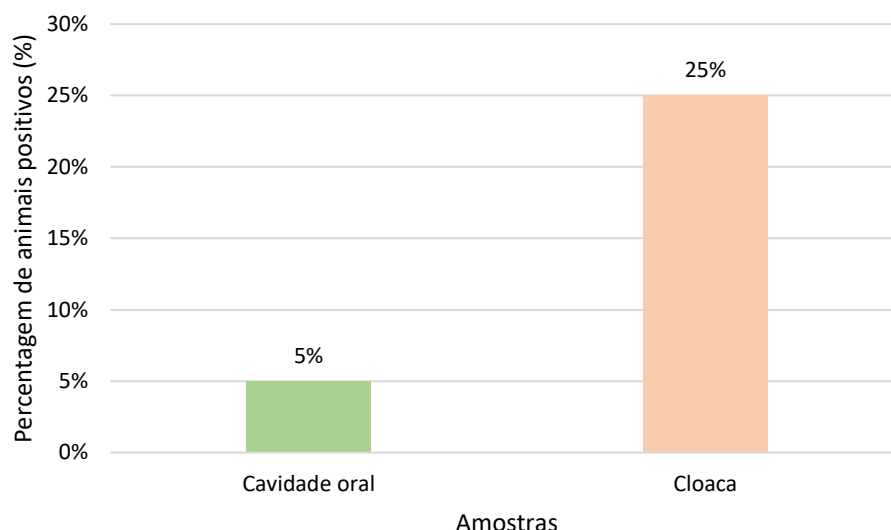


Figura 13: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para *Salmonella* spp., na cavidade oral e na cloaca.

Em relação à serotipificação da *Salmonella* spp. esta foi realizada em todos os isolados de *Salmonella* spp., contudo em um dos isolados da cloaca, a serotipificação não foi concreta quanto ao serotipo. Entre os restantes isolados da cloaca os serotipos identificados foram *Salmonella subsp. enterica enterica* ser. pomona (n=1), *Salmonella subsp. enterica diarizonae* ser. 53:k:e,n,x,z15 (n=1) e *Salmonella subsp. enterica* ser. kentucky (n=2). Em relação ao serotipo identificado na cavidade oral foi *Salmonella enterica* ser. kentucky (n=1) (Figura 14).

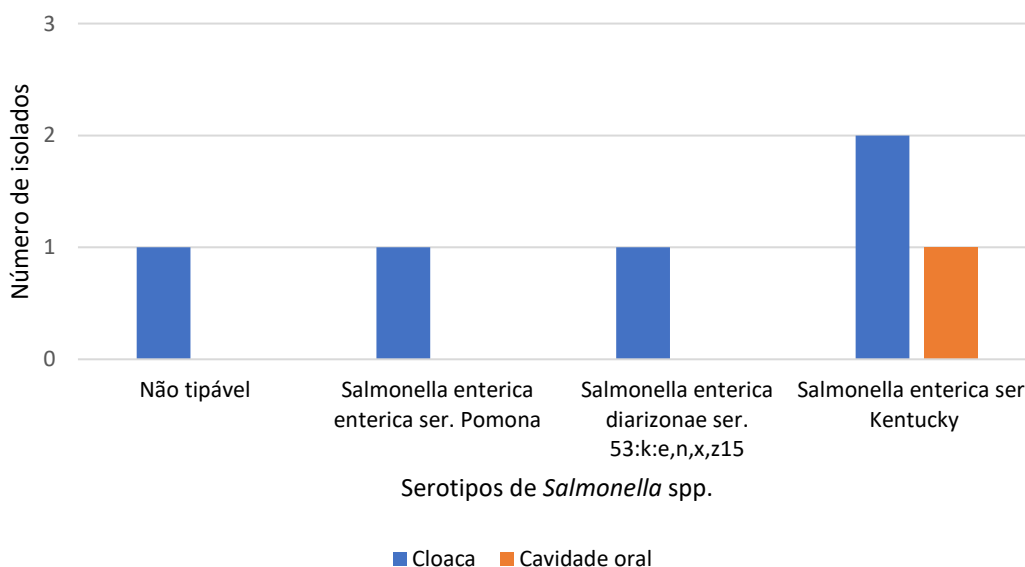


Figura 14: Representação gráfica dos resultados dos serotipos de *Salmonella* spp. obtidos nas diferentes amostras dos dragões barbudos.

Em termos de análise estatística não foi encontrada significância em termos da presença de *Salmonella* spp. na cloaca em relação à cavidade oral ($p=0.1818$).

Teste de sensibilidade a antibióticos para *Salmonella* spp.

Para os isolados de *Salmonella* spp. referidos anteriormente foi realizado o teste de suscetibilidade a antibióticos por difusão de disco para 19 antibióticos. Verificou-se que os seis isolados foram sensíveis para todos as classes de antibióticos estudados. Não se observando assim resistências aos antibióticos estudados nos isolados de *Salmonella* spp. de dragões barbudos saudáveis (Tabela 6).

Tabela 6: Sensibilidade para os isolados de *Salmonella* spp. nos dragões barbudos nas amostras da cavidade oral (n=1) e cloaca (n=5).

Antibiótico	Cavidade oral %, (n)	Cloaca %, (n)
Ampicilina	100, (n=1)	100, (n=5)
Amoxicilina/acido clavulânico	100, (n=1)	100, (n=5)
Ceftazidima	100, (n=1)	100, (n=5)
Cefotaxima	100, (n=1)	100, (n=5)
Cefepime	100, (n=1)	100, (n=5)
Cefoxitina	100, (n=1)	100, (n=5)
Piperacilina	100, (n=1)	100, (n=5)
Piperacilina/tazobactam	100, (n=1)	100, (n=5)
Ácido nalidíxico	100, (n=1)	100, (n=5)
Pefloxacina	100, (n=1)	100, (n=5)
Levofloxacina	100, (n=1)	100, (n=5)
Imepeneme	100, (n=1)	100, (n=5)
Meropenemo	100, (n=1)	100, (n=5)
Ertapeneme	100, (n=1)	100, (n=5)
Tetraciclina	100, (n=1)	100, (n=5)
Cloranfenicol	100, (n=1)	100, (n=5)
Gentamicina	100, (n=1)	100, (n=5)
Amicacina	100, (n=1)	100, (n=5)
Trimetoprim/sulfametoxazole	100, (n=1)	100, (n=5)

Pesquisa de Enterobacterales produtoras de ESBLs/AmpC

Como referido na secção de material e métodos foi realizada a pesquisa de Enterobacterales resistentes as C3G. Neste estudo 10.0% (n=2/20) dos dragões barbudos estavam colonizados com Enterobacterales resistentes às C3G (Figura 15). Em um dos dragões barbudos foi detetada *klebsiella aerogenes* resistente às C3G na cavidade oral e na cloaca. Em outro animal foi identificada *E. coli* resistente às C3G na cloaca, pertencendo ao grupo filogenético B1, de acordo com a classificação de Clermont et al. 2020 (Figura 15).

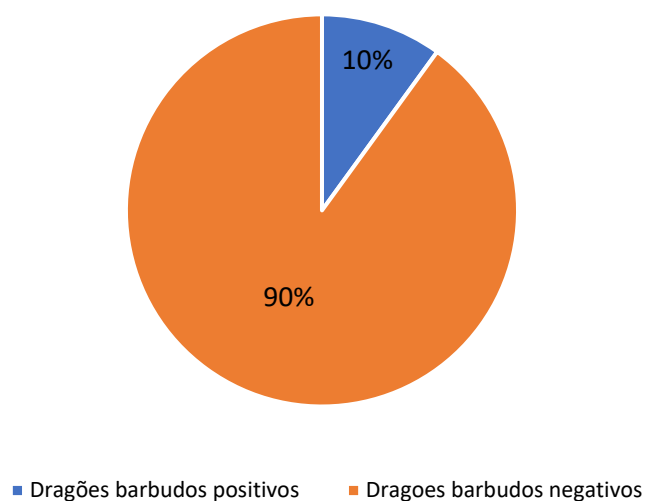


Figura 15: Representação gráfica da frequência relativa de Enterobacteriales resistentes às cefalosporinas de terceira geração nos dragões barbudos.

Quanto ao perfil de resistências observado para *K. aerogenes* isolada da cavidade oral, esta apresentou resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina, amoxiciclina/ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, cefepima, piperacilina +tazobactam), ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, amicacina e nitrofurantoína (Tabela 7). Como esta bactéria é resistente a pelo menos um antibiótico em três classes, é considerada uma bactéria MDR. Enquanto na amostra cloacal, o isolado de *Klebsiella aerogenes* apresentou as seguintes resistências aos antibióticos: ampicilina, amoxiciclina/ácido clavulânico, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, cefepima, piperacilina/tazobactam, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina e doxiciclina. Sendo esta bactéria considerada MDR. Não foram registradas resistências aos carbapenemos.

Quanto à caracterização genotípica dos isolados de *klebsiella aerogenes* resistentes às C3G, estes foram caracterizadas quanto à presença de ESBL e AmpC. Verificando-se a presença dos genes *bla_{TEM}* e *bla_{DHA}* em ambos os isolados (Tabela 7).

Quanto ao perfil de resistência observado para *E. coli* obtida da cloaca, esta apresentou resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina, amoxiciclina/ácido clavulânico, cefotaxima, cefepima, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, amicacina e a trimetoprim/ sulfametoxazol. A resistência aos carbapenemos não foi detetada. A bactéria apresenta resistência a quatro classes de antibióticos, sendo assim considerada uma bactéria MDR (Tabela 7).

Quanto à caracterização genotípica do isolado de *E.coli* resistente às C3G, verificou-se a presença dos genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M grupo 1} (Tabela 7).

Tabela 7: Enterobacterales produtoras de ESBLs/AmpC nos isolados de dragões barbudos.

Identificação animal	Tipo de amostra	Enterobacterales	Perfil de resistência aos antibióticos	MDR	Genes de resistência
ULHTAD2	Cloaca	<i>E. coli</i>	AMP ^R -AMC ^R -CTX ^R - CAZ ^I -FEP ^R -NA ^R - CIP ^R -LEV ^R -CN ^R - AK ^R -STX ^R	sim	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M- grupo 1}
ULHTAD6	Cloaca	<i>K. aerogenes</i>	AMP ^{R*} -AMC ^R -CTX ^R - CAZ ^R -FOX ^R - FEP ^R - PRL ^R -TZP ^R -NA ^R - CIP ^R -LEV ^R -DOX ^R	sim	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{DHA}
ULHTAD6	Cavidade oral	<i>K. aerogenes</i>	AMP ^{R*} -AMC ^R -CTX ^R - CAZ ^R -FOX ^R - FEP ^R - PRL ^R -TZP ^R -NA ^R - CIP ^R -LEV ^R -CN ^R - AK ^R -FR	sim	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{DHA}

Legenda: AK- Amicacina, AMC- Amoxicilina/ácido clavulânico, AMP- Ampicilina, CAZ- Ceftazidima, CIP- Ciprofloxacina, CN- Gentamicina, CTX- Cefotaxima, DOX- Doxiciclina, F- Nitrofurantoína, FEP- Cefepime, FOX- Cefoxitina, LEV- Levofloxacina, NA- Ácido nalidixico, PRL- Piperacilina, STX- Trimetoprim/Sulfametoxazol TZP- Piperacilina/tazobactam; ^R Resistente; ^I Intermédio * A bactéria do género *klebsiella* são intrinsecamente resistentes á ampicilina.

Pesquisa de Pseudomonadales

Em relação à pesquisa de *Pseudomonas* spp. nas amostras dos dragões barbudos, 45% (n=9/20) das amostras cloacais deram positivo para o género *Pseudomonas* (Figura 16), sendo que 11,1% (n=1/9) positivo para *Pseudomonas* spp. e 88,9% (n=8/9) positivo para *Pseudomonas aeruginosa*. Por outro lado, 15% (n=3/20) deram positivo para *Pseudomonas* em amostras orais, das quais 33,3% (n=1/3) positivo para *Pseudomonas* spp. e 66,7% (n=2/3) positivo para *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 8).

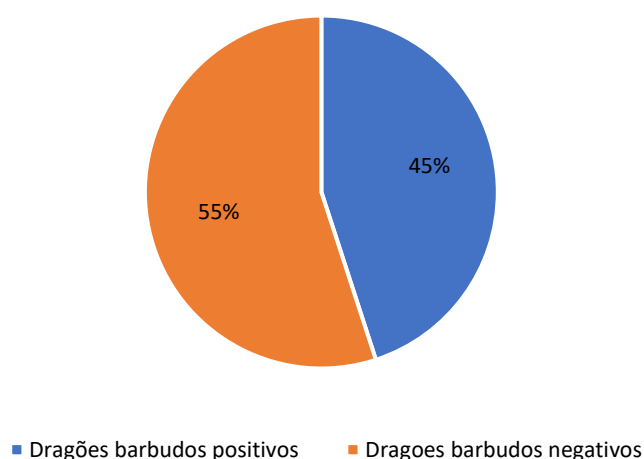


Figura 16: Representação gráfica da frequência relativa de dragões barbudos positivos para Pseudomonadales.

Apenas três *P. aeruginosa* das amostras cloacais apresentou resistência a antibióticos, entre as quais uma delas apresenta resistência a ceftazidima, enquanto as outras duas apresentaram resistência a enrofloxacina (Tabela 8).

Tabela 8: Pseudomonadales nas amostras isoladas dos dragões barbudos e perfil de resistências aos antibióticos.

Identificação do animal	Tipo de amostra	Pseudomonadales	Perfil de resistência aos antibióticos
ULHTAD3	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PRL ^I -TZP ^I - CAZ ^R
ULHTAD9	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^I
ULHTAD10	Cloaca	<i>Pseudomonas</i> spp.	PRL ^I -TZP ^I - ENR ^I
ULHTAD11	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^R
ULHTAD14	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^I
ULHTAD15	Cavidade oral	<i>Pseudomonas</i> spp.	PRL ^I -TZP ^I
ULHTAD15	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PRL ^I -TZP ^I
ULHTAD16	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*
ULHTAD17	Cavidade oral	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^I
ULHTAD17	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^R
ULHTAD20	Cavidade oral	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^I
ULHTAD20	Cloaca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ENR ^I

Legenda: CAZ- Ceftazidima; ENR-Enrofloxacina; PRL-Piperacilina; TZP-Piperacilina/tazobactam; ^I- Intermédio; ^R- Resistente; * nenhuma resistência.

Em termos de análise estatística não foi encontrada significância em termos da presença de Pseudomonadales na cloaca em relação à cavidade oral ($p=0.0824$).

Capítulo V

6. Discussão

O presente estudo teve como principal objetivo a pesquisa de bactérias zoonóticas, como *Salmonella* spp, Pseudomonadales e Enterobacterales resistentes às C3G, em amostras da cavidade oral e cloaca em dragões barbudos (*Pogona vitticeps*) saudáveis.

Neste estudo apenas 10% (n=2/20) das amostras foram resistentes às C3G, entre as quais foi identificada *E. coli* e *K. aerogenes*. Em relação à *Salmonella* spp, 25 % dos animais foram positivos e em relação à Pseudomonadales 45% foram positivos.

Segundo o estudo realizado por Cristina e colaboradores (2022) foram analisadas amostras de répteis, incluindo 166 tartarugas, 98 serpentes e 125 lagartos, sendo que as bactérias mais frequentemente isoladas incluíram *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp. Além disso, *Streptococcus* spp. beta-hemolítico e *Staphylococcus aureus* foram encontrados, sendo estas as únicas bactérias Gram positivas identificadas no estudo (Cristina et al., 2022).

A salmonelose associada a répteis é um problema de saúde pública persistente, particularmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos (Kiebler et al., 2020). Num estudo realizado por Kiebler e colaboradores nos Estados Unidos em 2020 identificaram que entre 2012-2014 *Salmonella* spp. foi a responsável pelo surto de doenças relacionadas à exposição de crianças pequenas a dragões barbudos como animais de estimação (Kiebler et al., 2020). No entanto, o facto das crianças com menos 2/3 anos estarem raramente em contato direto com os répteis, indica que a maioria das infeções neste surto foi contraída de forma indireta, ou seja, por contato com superfícies contaminadas ou roupas, o que leva a enfatizar a importância de se aumentar a conscientização dos tutores e criadores sobre a possibilidade de transmissão indireta de *Salmonella* spp. (Kiebler et al., 2020).

Entre o género *Salmonella* serotipificadas neste estudo foi identificado o serotipo *S. entérica* ser Pomona. Este serotipo é altamente patogénico, e foi inicialmente identificada em perus (Hinshaw et al., 1944), mais tarde detetado em tartarugas, em outros répteis e seres humanos (Tauxe et al., 1985; Woodward et al., 1997; Franco et al., 2011). Desde a década de 1980, a *S. entérica* ser Pomona tornou-se uma séria preocupação para a saúde pública devido ao aumento dos casos de infeção em humanos (Tauxe et al., 1985; Bertrand et al., 2008; Centers for Disease Control and Prevention, 2007). Nas crianças, as infeções podem ser extremamente graves, resultando em diarreia hemorrágica, febre, cólicas e ocasionalmente morte (Tauxe et al., 1985; CDC, 2007).

Atualmente, os surtos de *S. entérica* ser pomona ocorrem especialmente nos Estados Unidos, sendo que a maioria destas infecções estão associadas ao contato com tartarugas e outros répteis (Woodward et al., 1997; Centers for Disease Control Prevention, 2007; Bertrand et al., 2008). Num estudo realizado por Gong e colaboradores (2014) foram isoladas colônias de *S. entérica* ser. pomona em 39.0 % (n=16/41) das tartarugas de orelha vermelha (*Trachemys scripta elegans*) presentes em estado selvagem na China. Mais tarde, em 2017, Sakaguchi e colaboradores isolaram *S. entérica* ser Pomona de amostras de intestino e de pulmão em 6 jacarés numa quinta na Austrália, tendo sido encontradas lesões através da necrópsia, como enterocolite fibrinonecrótica, esplenite necrosante, efusão celômica e edema perivisceral e pulmonar (Sakaguchi et al., 2017).

Para além da *S. entérica* ser. pomona, neste estudo também foi identificada a salmonella *entérica* ser. diarizonae. Esta é uma bactéria frequentemente isolada no meio ambiente, répteis, ovelhas e humanos. Num estudo realizado por Lukac e colaboradores (2015), este serotipo foi identificado em 13% (n=26/200) dos répteis do Zoo de Zagreb ou de particulares. Adicionalmente, num estudo realizado na Alemanha por Schroter e colaboradores (2004), com o objetivo de avaliar a prevalência de *Salmonella* spp., foram colhidas amostras fecais de 10 víboras cornudas (*Bitis nasicornis*) e de 6 víboras de cílios (*Bothriechis schlegeli*), sendo que a estirpe *S. diarizonae* foi isolada em 100% (n=10/10) das víboras cornudas e 50% (n=3/6) das víboras de cílios.

Já foram descritos vários estudos em matadouros a nível mundial a presença de *S. entérica* ser. diarizonae em ovelhas saudáveis, como no Reino Unido (Davies et al., 2001), Noruega (Sandberg et al., 2002), Suíça (Stokar-Regenscheit et al., 2017), Islândia (Hjartardottir et al., 2002), Suécia (Sörén et al., 2015) e Estados Unidos (Wolf & Schefers; 2017). No entanto, também foram observados sinais clínicos como a rinite proliferativa crónica, um distúrbio do trato respiratório superior em ovelhas associado a *S. entérica* ser. *diarizonae*, que foi inicialmente reportada nos Estados Unidos por duas ocasiões em 1992 (Meehan et al., 1992) e em 2017 (Wolf & Schefers, 2017) e posteriormente identificada em Espanha (Lacasta et al., 2012), Suíça (Stokar-Regenscheit et al., 2017).

Já existem relatos de humanos infetados por *S. entérica* ser diarizonae através do contato com répteis, maioritariamente com cobras, em que se acredita que é o maior reservatório deste serotipo de *Salmonella* spp.. Conforme descrito no estudo realizado por Horvath e colaboradores (2016), um proprietário de cinco cobras de estimação foi identificado como portador de *S. entérica* ser. diarizonae. O paciente apresentou sintomas como febre intermitente, dor na região dos seios maxilares e frontais, leve secreção nasal e problemas gastrointestinais, incluindo desconforto epigástrico, diarreia e náuseas. Posteriormente, foram

realizadas culturas fecais tanto no paciente como em três das cobras, e a mesma bactéria encontrada no paciente foi isolada nos animais. Notavelmente, o proprietário das cobras não seguia práticas adequadas de higiene, tais como lavar as mãos após manipular os répteis, alimentá-los ou limpar o terrário (Horvath et al., 2016).

Neste estudo também foi identificado o serotipo de *S entérica* ser. Kentucky. Este serotipo é frequentemente encontrado nos sistemas gastrointestinais de aves, vacas e outros animais, e ocasionalmente afeta os seres humanos (Vosik et al., 2018).

O serotipo kentucky é polifilético, com duas linhagens clonais distintas, kentucky-I e kentucky-II (Vosik et al., 2018). Os serotipos isolados de kentucky-I estão mais associados a frangos de corte, enquanto os isolados pertencentes a kentucky-II estão mais comumente associados a bovinos e a humanos. Contudo esta discriminação do serotipo não é possível pelo método de serotipagem, apenas é possível por *Whole Genome Sequence* (WGS) (Richards et al., 2023).

Salmonella enterica ser kentucky é reconhecida como o serotipo de *Salmonella* mais prevalente em frangos de corte nos Estados Unidos e em alguns países europeus, sendo que já foram descobertas estirpes com resistência à ciprofloxacina (Hello et al., 2011)

De acordo com o estudo conduzido por Zajac e colaboradores (2013), foi identificada a presença da *Salmonella entérica* ser kentucky em 24 répteis, principalmente em amostras fecais, na Polónia. Essas amostras foram associadas à mesma estirpe de *Salmonella entérica* ser kentucky encontrada anteriormente em carne de peru, carne de aves e ração de aves, conforme descrito por Wasyl e Hoszowski em 2012. A análise revelou uma semelhança filogenética de 67,3% entre os serotipos (Zajac et al., 2013).

No estudo realizado por Wasyl e Hoszowski (2012), foi isolada uma estirpe de *S. entérica* ser kentucky multirresistente que apresentava resistência a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, tendo sido identificado o gene *bla*_{CTX-M}. Sendo ainda resistente às quinolonas, tetraciclina, aminoglicosídeos e sulfametoxazol.

Assim é fundamental que todos os envolvidos como médicos, veterinários e as pessoas da indústria de animais de estimação colaborem para informar as famílias sobre o risco de infecção por *Salmonella* spp proveniente de répteis. Além disso, é necessário que a indústria de répteis de estimação explore os pontos críticos de biossegurança no processo de reprodução de répteis, incluindo dos dragões barbudos, o que ajudará a reduzir a contaminação geral por *Salmonella* spp. nestas espécies de animais (Kiebler et al., 2020).

E. coli é uma bactéria que pode ser encontrada no sistema gastrointestinal de répteis, mamíferos e aves. A presença desta bactéria é geralmente considerada comensal na microbiota intestinal, no entanto esta pode causar doença se o animal se encontrar imunocomprometido. Neste estudo realizado, foi isolada *E. coli* numa amostra cloacal, em semelhança com Ramos e colaboradores em 2019, que realizaram um estudo em 76 amostras de fezes através de zaragatoas cloacais de répteis no Brasil, onde a *E. coli* foi identificada em 68,4% (n=52/76) dos animais incluídos no estudo, sendo que 50.0% (n=38/76) foram em serpentes, 9,2% (n=7/76) de lagartos e 9,1 % (n=7/76). em tartarugas.

Ksiazczyk e colaboradores (2021) realizaram um estudo onde foram colhidas 120 amostras de fezes de répteis do zoo de Breslávia, em que em 20% (n=24/120) foram positivas para *E. coli*. Posteriormente, Dec e colaboradores em 2022 estudaram 67 amostras de fezes de várias espécies de cobras (n=31), lagartos (n=18) e tartarugas (n=18) em que 47.8%(n=32/76) amostras deram positivo para *E. coli*, sendo que desses 18 lagartos eram 6 dragões barbudos, de onde 83% amostras foram positivas (n=5/6). A maioria dos isolados de *E. coli* (71,97%, n=23/32) demonstraram sensibilidade a todos os agentes antibióticos testados. Entre os isolados remanescentes, observou-se que a resistência à estreptomicina (21,87%, n=7/32) foi o fenótipo de resistência mais comum encontrado. Só uma estirpe se definiu como multirresistente (Dec et al., 2022).

Klebsiella aerogenes, anteriormente designada de *Enterobacter aerogenes* é uma bactéria oportunista Gram-negativa, continuamente encontrada em répteis, animais de companhia convencionais como o cão e em humanos. Assim como observado no estudo conduzido por Jho e colaboradores (2011), que identificaram num total de 36 amostras orais e cloacais de 18 pitons da Birmânia (*Python molurus bivittatus*), a presença de *Klebsiella aerogenes* numa amostra oral (Jho et al., 2011), o presente estudo revelou a presença de *K. aerogenes* em amostras orais e cloacais.

Adicionalmente, no estudo de Martins e colaboradores (2017) foi identificada a espécie de *Klebsiella aerogenes* numa ferida na pele de uma Boa Constrictor (*Boa constrictor amarali*), encontrando-se também desidratada e com as mucosas pálidas (Martins et al., 2017). Foi também realizado um estudo em cães por Zhang e colaboradores (2018) com o objetivo de descobrir a prevalência de enterobacterales resistentes a cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftazidima ou cefpodoxima) em amostras clínicas e fecais de cães no Canadá, tendo sido isoladas em 0.01% (n=7/506) amostras clínicas colónias de *Klebsiella aerogenes*.

Já em 2023 num relato de caso de medicina humana realizado por Mazumder e colaboradores foi isolada *Klebsiella aerogenes* responsável por uma infeção do trato urinário

resistente a aminoglicosídeos, β -lactâmicos (penicilina), β -lactâmicos (cefalosporinas), anfenicóis, fluoroquinolonas, tetraciclina e gliciliclinas.

Klebsiella aerogenes é encontrada em amostras clínicas humanas, incluindo do trato respiratório, urinário, sangue e gastrointestinal (Langley et al., 2001). A epidemiologia dessa espécie é notável na Europa, especialmente a partir de 1993, quando começaram a surgir surtos de infecções hospitalares, principalmente na Europa Ocidental (Jalaluddin et al., 1998).

Uma outra bactéria com impacto zoonótico encontrada neste estudo foi *Pseudomonas aeruginosa*. Está descrito que esta bactéria é normalmente encontrada em répteis em cativeiro, conhecidos por serem um reservatório deste microrganismo e fontes de exposição humana através de contato fecal, mordeduras ou arranhões (Ebani et al., 2008). As infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* em seres humanos têm sido associadas a diversas doenças, afetando o trato respiratório, sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal, sistema nervoso central, trato urinário, ouvidos, olhos, pele, ossos e articulações (Talbot et al., 2006). Em ambientes de cuidados intensivos, esta bactéria é responsável por infecções potencialmente fatais em indivíduos com sistemas imunitários comprometidos, especialmente em pacientes com cancro submetidos a quimioterapia ou em pacientes com fibrose quística (Rossolini & Mantengoli, 2005; Talbot et al., 2006).

No estudo de Foti e colaboradores (2013), foram colhidas um total de 65 zaragatoas orais em 15 diferentes espécies de répteis saudáveis, no qual um total de 46 amostras (70,8%) foram identificadas como pertencente à espécie *P. aeruginosa*. Desses 65 animais, foram colhidas 4 zaragatoas em dragões barbudos em que 2 deles deram positivo (50%). Ainda foram testados vários antibióticos e foi observado que as taxas mais elevadas de resistência foram para imipenem + cilastatina (100%), penicilina G (95,6%) e sulfametoxazol (93,5%), seguidas por eritromicina e vancomicina (91,3%), doxiciclina (85,3%) e tetraciclina (80,4%), cefalexina, cefalotina e rifampicina (78,3%), ampicilina (71,7%) e ácido nalidíxico (69,6%) (Foti et al., 2013).

Em outro estudo realizado por Sala e colaboradores (2019) foram colhidas 419 amostras de zaragatoas cloacais de cobras da família *Boidae* (38), *Colubridae* (48) e *Pythonidae* (326), sendo a prevalência de *P. aeruginosa* de 251 (59,9%) e destas 251 amostras 89 (35,5%) são multirresistentes (Sala et al., 2019). Xiong e colaboradores (2022) isolaram *P. aeruginosa* numa úlcera na pele de um lagarto crocodilo chinês (*Shinisaurus crocodilurus*) (Xiong et al., 2022).

Pseudomonas aeruginosa foi isolada da cavidade oral e pulmões de duas jiboias (*Boa constrictor*) e de uma píton indiana (*Python molurus*) que sofriam de estomatite e pneumonia (Aleksandrov e Petkov, 1985).

Num estudo realizado no Jardim Zoológico de Lisboa, isolaram *Pseudomonas aeruginosa* em um Varano do nilo (*Varanus niloticus*) que se encontrava anorético e prostrado. Realizaram a necrópsia, em que na análise macroscópica da cavidade celômica registou-se congestão pulmonar, bem como um estômago e íleo ligeiramente espessado e hepatomegalia. A análise histopatológica revelou enterite fibrinonecrótica grave com múltiplos agregados bacterianos. Os pulmões apresentavam edema e pneumonia exsudativa, bem como múltiplos agregados bacterianos (Seixas et al., 2014).

Uma das limitações deste estudo foi o número de animais utilizados, não se verificando assim uma associação da presença de *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp. em amostras da cloaca. Em estudos futuros, será importante aumentar o tamanho da amostra, para permitir a deteção de possíveis fatores de risco. Para além disso será importante e interessante incluir amostras do alimento e amostras ambientais, de modo a compreender a origem destes agentes zoonóticos.

Até à data e para nosso conhecimento é o primeiro estudo realizado em dragões barbudos com deteção de Enterobacterales resistentes às C3G e produtoras de ESBLs e AmpC. Para além disso é também primeiro estudo com a deteção de *salmonella* entérica ser. Kentucky e de *salmonella* entérica ser. Pomona em dragões barbudos. Os resultados obtidos neste estudo são relevantes para um contexto *One-health* e para a prática clínica de Medicina Veterinária em répteis.

Em outros estudos realizados em répteis, para além da *Salmonella* spp., a *Escherichia coli* e a *Klebsiella aerogenes* são detetadas com alguma frequência. No entanto, neste estudo, apenas *E. coli* e *K. aerogenes* resistentes às C3G foram investigados. Tendo sido identificados os genes verificou-se a presença dos genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M grupo 1}. Assim não foi possível perceber a frequência relativa destas bactérias nos dragões barbudos.

Em termos futuros seria importante caracterizar a microbiota residente da cavidade oral e da cloaca, realizar a sua caracterização fenotípica, genotípica e patogenicidade.

Capítulo VI

7. Conclusão

O propósito deste estudo, com uma amostragem de 20 dragões barbudos saudáveis, foi identificar Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de terceira geração, *Salmonella* spp. e Pseudomonadales presentes nas cavidades oral e cloacal. Os objetivos delineados foram plenamente alcançados, revelando a presença de sete espécies bacterianas distintas, incluindo *Salmonella enterica enterica* ser. Pomona, *Salmonella enterica* Diarizonae, *Salmonella enterica enterica* ser. Kentucky, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., assim como duas bactérias multirresistentes, *E. coli* e *Klebsiella aerogenes*.

Os resultados obtidos oferecem uma contribuição vital para a compreensão dos potenciais riscos zoonóticos associados à interação próxima com estes répteis de estimação, bem como para a disseminação de bactérias multirresistentes. Este estudo ressalta a importância de uma abordagem holística na gestão da saúde, envolvendo médicos veterinários, profissionais de saúde humana e tutores de animais de estimação.

Destaca-se, sobretudo, a necessidade permanente de adoção de medidas rigorosas de higiene por parte dos tutores, visando diminuir o risco de transmissão dessas bactérias para indivíduos imunocomprometidos.

Entretanto, mais informação deve ser recolhida e que há espaço para a expansão do conhecimento. Por exemplo, a realização de estudos com amostragens mais amplas para uma compreensão mais abrangente. Ou por outro lado, uma investigação mais aprofundada sobre a composição bacteriana, seja resistente ou não, na flora oral e cloacal de dragões barbudos.

Bibliografia

Abrahamian, F. M., & Goldstein, E. J. (2011). Microbiology of animal bite wound infections. *Clinical microbiology reviews*, 24(2), 231–246. <https://doi.org/10.1128/CMR.00041-10>

Aleksandrov, M., & Petkov, A. (1985). Sluchař na infektsiia s *Pseudomonas aeruginosa* pri tropicheski zmii [Case of *Pseudomonas aeruginosa* infection in tropical snakes]. *Veterinarno-meditsinski nauki*, 22(7), 53–61.

Alvseike, O., & Skjerve, E. (2002). Prevalence of a *Salmonella* subspecies diarizonae in Norwegian sheep herds. *Preventive veterinary medicine*, 52(3-4), 277–285. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00252-5](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00252-5)

Austin, C.C., & Wilkins, M.J. (1998). Reptile-associated salmonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212 6, 866-7 Clancy, M. M., Davis, M.,

AVMA Pet Ownership and Demographics Sourcebook (2017). American Veterinary Medical Association. 2017. Disponível em: <https://www.avma.org/resources-tools/reports-statistics/us-petownership-statistics>, acedido 9/9/2023

Babalola, M. O., & Balogun, J. A. (2013). The ecology and potential health risk of the oral microflora of *Python regius* and *Clelia scyntalina*. *International Journal of Microbiology Research*, 5(1), 349-56.

Baines, F. (2018). True full spectrum lighting for zoo animals. In: *Proceedings of the British Veterinary Zoological Society*, 20. BVZS.

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493–496.

Bayot ML, Bragg BN (2023). Antimicrobial Susceptibility Testing. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>

Beck, K., Loomis, M., Lewbart, G., Spelman, L., & Papich, M. (1995). Preliminary comparison of plasma concentrations of gentamicin injected into the cranial and caudal limb musculature of the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 265-268.

Belas, A., Marques, C., Menezes, J., da Gama, L. T., Cavaco-Silva, P., & Pomba, C. (2022). ESBL/pAmpC-Producing *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections in Non-Related Companion Animals and Humans. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(5), 559. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050559>

Bermingham, N., Luettich, K. (2003). Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*, 159 - 164.

Bertrand, S., Rimhanen-Finne, R., Weill, F. X., Rabsch, W., Thornton, L., Perevoscikovs, J., van Pelt, W., & Heck, M. (2008). Salmonella infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 13(24), 18902.

Blaylock RSM (2001) Normal oral bacterial flora from some southern African snakes. *Onderstepoort J Vet Res* 68:175–182

Bosco-Lauth, A. M., Hartwig, A. E., & Bowen, R. A. (2018). Reptiles and Amphibians as Potential Reservoir Hosts of Chikungunya Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(3), 841–844. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0730>

Boyer, T.H. (2015). Diseases of bearded dragons, In: Proceedings of the Pacific Veterinary Conference. Long Beach, CA, 18–21 June: 1–6.

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

Canıça, M. M., Lu, C. Y., Krishnamoorthy, R., & Paul, G. C. (1997). Molecular Diversity and Evolution of *bla* TEM Genes Encoding β -Lactamases Resistant to Clavulanic Acid in Clinical *E. coli*. *J Mol Evol* 44, 57–65. <https://doi.org/10.1007/PL00006121>

Cannon, M.J. (2003). Husbandry and veterinary aspects of the bearded dragon (*Pogona* spp.) in Australia. *Seminars In Avian and Exotic Pet Medicine* 12 (4): 205–214. [https://doi.org/10.1053/S1055-937X\(03\)00036-7](https://doi.org/10.1053/S1055-937X(03)00036-7)

Casey, C. L., Hernandez, S. M., Yabsley, M. J., Smith, K. F., & Sanchez, S. (2015). The carriage of antibiotic resistance by enteric bacteria from imported tokay geckos (*Gekko gecko*) destined for the pet trade. *Science of the Total Environment*, 505, 299-305.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2007). Turtle-associated salmonellosis in humans--United States, 2006-2007. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 56(26), 649-652.

Chung TH, Yi SW, Kim BS, Kim WI, Shin GW. Identification and antibiotic resistance profiling of bacterial isolates from septicemic soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *Vet Med-Czech*. 2017;62(3):169-177. doi: 10.17221/65/2016-VETMED.

Clancy, M. M., Davis, M., Valitutto, M. T., Nelson, K., & Sykes, J. M., 4th (2016). Salmonella infection and carriage in reptiles in a zoological collection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(9), 1050–1059. <https://doi.org/10.2460/javma.248.9.1050>

Clancy, M. M., Newton, A. L., & Sykes, J. M. (2016). Management of osteomyelitis caused by *salmonella enterica* subsp. *houteanae* in a taylor's cantil (*agkistrodon bilineatus taylori*) using amikacin delivered via osmotic pump. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 47(2), 691–694. <https://doi.org/10.1638/2015-0207.1>

Clarke, D. and Cameron, A. (1998), Relationship between diet, dental calculus and periodontal disease in domestic and feral cats in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 76: 690-693. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb12284.x>

Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Informational Supplement*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.

Colombo, A. P. V., Paster, B. J., Grimaldi, G., Lourenço, T. G. B., Teva, A., Campos-Neto, A., McCluskey, J., Kleanthous, H., Van Dyke, T. E., & Stashenko, P. (2017). Clinical and microbiological parameters of naturally occurring periodontitis in the non-human primate *Macaca mulatta*. *Journal of oral microbiology*, 9(1), 1403843. DOI: [10.1080/20002297.2017.1403843](https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1403843)

Cooper, J.S., Poole, D.F.G. and Lawson, R. (1970), The dentition of agamid lizards with special reference to tooth replacement. *Journal of Zoology*, 162: 85-98. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1970.tb01259.x>

Cristina, R. T., Kocsis, R., Dégi, J., Muselin, F., Dumitrescu, E., Tirziu, E., Herman, V., Darău, A. P., & Oprescu, I. (2022). Pathology and Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Study of 398 Pet Reptiles. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(10), 1279. <https://doi.org/10.3390/ani12101279>

Cui, X., Zhang, H., & Du, H. (2019). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Frontiers in microbiology*, 10, 1823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01823>

Cushing, A., Pinborough, M., & Stanford, M. (2011). Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *The Veterinary record*, 169(15), 390. <https://doi.org/10.1136/vr.d4636>

Davies, R. H., Evans, S. J., Preece, B. E., Chappell, S., Kidd, S., & Jones, Y. E. (2001). Increase in *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61: k: 1, 5, (7) in sheep. *The Veterinary Record*, 149(18), 555-557.

Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6, 392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>

Dec, M., Stepien-Pysniak, D., Szczepaniak, K., Turchi, B., & Urban-Chmiel, R. (2022). Virulence Profiles and Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Strains from Pet Reptiles. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(2), 127. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020127>

Doneley, B. (2006). Caring for the bearded dragon [review of *caring for the bearded dragon*]. *exotics — reptiles and amphibians*, pp. (1607–1611).

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3108–3110. <https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>

Deveson, I.W., Holleley, C.E., Blackburn, J. et al. (2017). Differential intron retention in Jumonji chromatin modifier genes is implicated in reptile temperature dependent sex determination. *Science Advances* 3 (6): e1700731

Drzewiecka D. (2016). Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial ecology*, 72(4), 741–758. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>

Divers, S. J., & Stahl, S. J. (2019). Lizard Taxonomy, Anatomy, and Physiology. S. Divers (Ed.), *Mader's reptile and amphibian medicine and surgery* (pp.63-74). Missouri. Elsevier.

Dosedělová, H., Štěpánková, K., Zikmund, T., Lesot, H., Kaiser, J., Novotný, K., Štembírek, J., Knotek, Z., Zahradníček, O. and Buchtová, M. (2016), Age-related changes in the tooth–bone interface area of acrodont dentition in the chameleon. *J. Anat.*, 229: 356-368. <https://doi.org/10.1111/joa.12490>

DTU food Nacional food Institute (2023).EU reference laboratory-Antimicrobial Resistance-protocols. Disponível em <https://www.eurl-ar.eu>. Consultado em maio 2023.

Ebani VV, Fratini F, Ampola M, et al. (2008) *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from domestic reptiles and study of their antimicrobial in vitro sensitivity. *Vet Res Commun*. 195–198; doi: 10.1007/S11259-008-9160-9

Ebani, V. V. (2017). Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 723–728. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.020>

Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Stratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003>

Elshamy, A. A., & Aboshanab, K. M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future science OA*, 6(3), FSO438. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0098>

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.

Ezaz, T., Quinn, A.E., Miura, I. et al. (2005). The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research* 13 (8): 763–776.

Ferreira Junior RS, Siqueira AK, Campagner MV, Salerno T, Soares TCS, Lucheis SB, Paes AC, Barraviera B (2009) Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesq Vet Bras* 29:999–1003.

Figueras, L., Ferrer, L. M., González, J. M., Bueso, J. P., Ramos, J. J., Rubira, I., Burian, E., & Lacasta, D. (2020). Prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1:5:(7) in nasal secretions and stool of sheep flocks with and without cases of chronic proliferative rhinitis. *Veterinary microbiology*, 247, 108767. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108767>

Foti, M., Giacopello, C., Fisichella, V., & Latella, G. (2013). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from captive reptiles. *Journal of exotic pet medicine*, 22(3), 270-274. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2013.08.007>

Franco, A., Hendriksen, R. S., Lorenzetti, S., Onorati, R., Gentile, G., Dell'Omo, G., Aarestrup, F. M., & Battisti, A. (2011). Characterization of *Salmonella* occurring at high prevalence in a population of the land iguana *Conolophus subcristatus* in Galápagos Islands, Ecuador. *PloS one*, 6(8), e23147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023147>

Giner-Lamia, J., Vinuesa, P., Betancor, L., Silva, C., Bisio, J., Soletto, L., Chabalgoity, J. A., Puente, J. L., *Salmonella* CYTED Network, & García-Del Portillo, F. (2020). Correction to: Genome analysis of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* isolates from invasive human infections reveals enrichment of virulence-related functions in lineage ST1256. *BMC genomics*, 21(1), 373. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06781-x>

Goldstein EJC, Agyare EO, Vagvolgyi AE, Halpern M (1981) Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. *J Clin Microbiol* 13:954–956.

Goldstein EJC, Citron DM, Gonzalez H, Russell FE, Finegold SM (1979) Bacteriology of rattlesnake venom and implications for therapy. *J Infect Dis* 140:818–821.

Gong, S., Wang, F., Shi, H., Zhou, P., Ge, Y., Hua, L., & Liu, W. (2014). Highly pathogenic *Salmonella* Pomona was first isolated from the exotic red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) in the wild in China: Implications for public health. *The Science of the total environment*, 468-469, 28–30. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.025>

Goupil, B. A., Trent, A. M., Bender, J., Olsen, K. E., Morningstar, B. R., & Wünschmann, A. (2012). A longitudinal study of *Salmonella* from snakes used in a public outreach program. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(4), 836-841.

Graham, D. C., & McKay, L. L. (1985). Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 532-534.

Grenard, S. (2008). *Bearded Dragon: Your Happy Healthy Pet*. Hoboken, NJ: Wiley Publishing Inc.

Grover, N., Sahni, A. K., & Bhattacharya, S. (2013). Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Medical journal, Armed Forces India*, 69(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2012.02.001>

Gray, M. J., Ossiboff, R. J., Berger, L., Bletz, M. C., Carter, E., DeMarchi, J. A....Wilber, M. Q. (2023). One Health Approach to Globalizing, Accelerating, and Focusing Amphibian and Reptile Disease Research—Reflections and Opinions from the First Global Amphibian and Reptile Disease Conference. *Emerging Infectious Diseases*, 29(10), 1-7. <https://doi.org/10.3201/eid2910.221899>.

Hacioglu, N., & Tosunoglu, M. (2014). Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. *Environmental monitoring and assessment*, 186(1), 407–413. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3385-y>

Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2020). The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(4), 186. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>

Heatley, J.J., Mitchell, M.A., Williams, J., Smith, J.A., & Tully, T.N. (2001). Fungal Periodontal Osteomyelitis in a Chameleon, *Furcifer pardalis*. *Journal of herpetological medicine and surgery*, 11, 7-12.

Hedley J. (2016). Anatomy and Disorders of the Oral Cavity of Reptiles and Amphibians. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 19(3), 689–706. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.04.002>

Hervás, J. A., Rosell, A., Hervás, D., Rubio, R., Dueñas, J., & Mena, A. (2012). Reptile pets-associated *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* gastroenteritis in a neonate. *The Pediatric infectious disease journal*, 31(10), 1102–1103. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318260530c>

Hilf, M., Swanson, D., Wagner, R., & Yu, V. L. (1991). Pharmacokinetics of piperacillin in blood pythons (*Python curtus*) and in vitro evaluation of efficacy against aerobic gram-negative bacteria. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 199-203.

Hinshaw, W. R., McNeil, E., & Taylor, T. J. (1944). Avian salmonellosis: types of *Salmonella* isolated and their relation to public health. *American Journal of Epidemiology*, 40(3), 264-278.

Hjartardóttir, S., Gunnarsson, E., & Sigvaldadóttir, J. (2002). *Salmonella* in sheep in Iceland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1), 1-6.

Holz, P. H., Burger, J. P., Pasloske, K., Baker, R., & Young, S. (2002). Effect of injection site on carbenicillin pharmacokinetics in the carpet python, *Morelia spilota*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 12(4), 12-16.

Horvath, L., Kraft, M., Fostiropoulos, K., Falkowski, A., & Tarr, P. E. (2016). *Salmonella enterica* Subspecies *diarizonae* Maxillary Sinusitis in a Snake Handler: First Report. *Open forum infectious diseases*, 3(2), ofw066. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw066>

Hsieh, S., & Babl, F. E. (1999). *Serratia marcescens* cellulitis following an iguana bite. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28(5), 1181–1182. <https://doi.org/10.1086/517778>

Jacobson, E., & Garner, M. (Eds.). (2021). *Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text, Two Volume Set*. CRC Press.

Jacobson, E.R. (1984) Biology and diseases of reptiles. In: Fox, J.G., B.J. Cohen, F.M. Loew, eds. *Laboratory Animal Medicine*. Orlando: Academic Press.

Jacobson, Elliott. (1978). Diseases of the respiratory system in reptiles. *Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC*. 73. 1169-75.

Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>

Jalaluddin, S., Devaster, J. M., Scheen, R., Gerard, M., & Butzler, J. P. (1998). Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgian hospital. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), 1846-1852.

Jho, Y. S., Park, D. H., Lee, J. H., Cha, S. Y., & Han, J. S. (2011). Identification of bacteria from the oral cavity and cloaca of snakes imported from Vietnam. *Laboratory animal research*, 27(3), 213–217. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.3.213>

Johnson, J (2007). Bearded Dragons (*Pogona vitticeps*). In: R. Larson (Ed.), *Unusual Pet Care*. (2^oEd., pp. 21-34). Florida: Zoological Education Network, Inc.

Jorgensen JH, Turnidge JD. (2007) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. (pp.1152-1172) Washington, DC: American Society for Microbiology.

Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>

Keymer, I. F. (1978a). Diseases of chelonians: (1). Necropsy survey of tortoises. *Vet. Rec*. 103: 548-552

Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Kiebler, C. A., Bottichio, L., Simmons, L., Basler, C., Klos, R., Gurfield, N., Roberts, E., Kimura, A., Lewis, L. S., Bird, K., Stiles, F., Schlater, L. K., Lantz, K., Edling, T., & Barton Behravesh, C. (2020). Outbreak of human infections with uncommon *Salmonella* serotypes linked to pet bearded dragons, 2012-2014. *Zoonoses and public health*, 67(4), 425–434. <https://doi.org/10.1111/zph.12701>

Kieser, J. A., Tkatchenko, T., Dean, M. C., Jones, M. E. H., Duncan, W., & Nelson, N. J. (2009). Microstructure of dental hard tissues and bone in the Tuatara dentary, *Sphenodon punctatus* (Diapsida: Lepidosauria: Rhynchocephalia). *Frontiers of oral biology*, 13, 80–85. <https://doi.org/10.1159/000242396>

Klaphake, E. (2010). A fresh look at metabolic bone diseases in reptiles and amphibians. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 13 (3): 375–392.

Książczyk, M., Dudek, B., Kuczkowski, M., O'Hara, R., Korzekwa, K., Wzorek, A., Korzeniowska-Kowal, A., Upton, M., Junka, A., Wieliczko, A., Ratajszczak, R., & Bugla-Płoskońska, G. (2021). The Phylogenetic Structure of Reptile, Avian and Uropathogenic *Escherichia coli* with Particular Reference to Extraintestinal Pathotypes. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1192. <https://doi.org/10.3390/ijms22031192>

Kubiak, M. (2012). Bearded Dragons. In: M. Kubiak (Ed.), *Handbook of Exotic Pet Medicine* (pp. 219-221). Bewdley: John Wiley & Sons Ltd.

Kwon, J., Kim, S. G., Kim, S. W., Yun, S., Kim, H. J., Giri, S. S., Han, S. J., Oh, W. T., & Park, S. C. (2019). A Case of Mortality Caused by *Aeromonas hydrophila* in Wild-Caught, Red-Eyed Crocodile Skinks (*Tribolonotus gracilis*). *Veterinary sciences*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010004>

Lacasta, D., Ferrer, L. M., Ramos, J. J., Bueso, J. P., Borobia, M., de Arcaute, M. R., ... & De las Heras, M. (2012). Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella enterica* subspecies diarizonae serovar 61: k: 1, 5,(7) in sheep in Spain. *Journal of comparative pathology*, 147(4), 406-409.

Lam KK, Crow P, Ng KHL, Shek KC, Fung HT, Ades G, Grioni A, Tan KS, Yip KT, Lung DC, Que TL, Lam TSK, Simpson ID, Tsui KL, Kam CW (2010) A cross-sectional survey of snake oral bacterial flora from Hong Kong, SAR, China. *Emerg Med J* 28:107–114.

Langley, J. M., Hanakowski, M., & Leblanc, J. C. (2001). Unique epidemiology of nosocomial urinary tract infection in children. *American journal of infection control*, 29(2), 94–98. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.111537>

Lawrence, K. (1983). The use of antibiotics in reptiles: A review. *Journal of Small Animal Practice*, 24(12), 741-752.

Lawrence, K., Muggleton, P. W., & Needham, J. R. (1984). Preliminary study on the use of ceftazidime, a broad-spectrum cephalosporin antibiotic, in snakes. *Research in veterinary science*, 36(1), 16-20.

Le Hello, S., Hendriksen, R. S., Doublet, B., Fisher, I., Nielsen, E. M., Whichard, J. M., Bouchrif, B., Fashae, K., Granier, S. A., Jourdan-Da Silva, N., Cloeckert, A., Threlfall, E. J., Angulo, F. J., Aarestrup, F. M., Wain, J., & Weill, F. X. (2011). International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *The Journal of infectious diseases*, 204(5), 675–684. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir409>

Lee, M. Y., Ko, K. S., Kang, C. I., Chung, D. R., Peck, K. R., & Song, J. H. (2011). High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 160-163.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (62), 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>

Liu, F. L., Kuan, N. L., & Yeh, K. S. (2021). Presence of the Extended-Spectrum- β -Lactamase and Plasmid-Mediated AmpC-Encoding Genes in *Escherichia coli* from Companion Animals-A Study from a University-Based Veterinary Hospital in Taipei, Taiwan. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1536. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121536>

Lukac, M., Pedersen, K., & Prukner-Radovic, E. (2015). PREVALENCE OF SALMONELLA IN CAPTIVE REPTILES FROM CROATIA. *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 46(2), 234–240. <https://doi.org/10.1638/2014-0098R1.1>

Macmillen, R., Augee, M., and Ellis, B. (1989). Thermal ecology and diet of some xerophilous lizards from western New South Wales. *Journal of Arid Environments* 16 (2): 193–201.

Mader DR, Divers SJ. (2013) Current therapy in reptile medicine and surgery. 1st ed. Missouri: Saunders Elsevier

Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect*, pp. (268–281).

Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., & Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 290–296. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>

Mans, C. (2013). Clinical update on diagnosis and management of disorders of the digestive system of reptiles. *Journal of exotic pet medicine*, 22(2), 141-162.

Marin, C., Lorenzo-Rebenaque, L., Laso, O., Villora-Gonzalez, J., & Vega, S. (2021). Pet Reptiles: A Potential Source of Transmission of Multidrug-Resistant *Salmonella*. *Frontiers in veterinary science*, 7, 613718. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.613718>

Martins, N. B., Ferreira, L. A. R., Santos, A. L. Q., de Souza, R. R., Oliveira, W. J., de Almeida Moreira, T., ... & Lima, A. M. C. (2017). Dermatopathy caused by enterobacter aerogenes and *Pseudomonas aeruginosa* in *Boa constrictor amarali*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45, 1-4. <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289050563009.pdf>

Mayer, J., & Donnelly, T. M. (2012). *Clinical veterinary advisor: birds and exotic pets*. Elsevier Health Sciences.

Mazumder, R., Hussain, A., Bhadra, B., Phelan, J., Campino, S., Clark, T. G., & Mondal, D. (2023). Case report: A successfully treated case of community-acquired urinary tract infection due

to *Klebsiella aerogenes* in Bangladesh. *Frontiers in medicine*, 10, 1206756. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1206756>

McCracken, H. Birch. A.(1994): Periodontal disease in lizards: a review of numerous cases. *Proc. Am. Assoc. Zoo Vet. Pittsburgh*, 108-115.

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>

Meehan, J. T., Brogden, K. A., Courtney, C., Cutlip, R. C., & Lehmkuhl, H. D. (1992). Chronic proliferative rhinitis associated with *Salmonella arizonae* in sheep. *Veterinary Pathology*, 29(6), 556-559.

Mehler, S. J., & Bennett, R. A. (2003). Oral, dental, and beak disorders of reptiles. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 6(3), 477–503. [https://doi.org/10.1016/s1094-9194\(03\)00032-x](https://doi.org/10.1016/s1094-9194(03)00032-x)

Mendoza-Roldan, J. A., Modry, D., & Otranto, D. (2020). Zoonotic Parasites of Reptiles: A Crawling Threat. *Trends in parasitology*, 36(8), 677–687. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.014>

Meredith, A., & Redrobe, S. (2002). *BSAVA manual of exotic pets* (No. Ed. 4). British Small Animal Veterinary Association.

Mitchell, M. A., & Diaz-Figueroa, O. (2005). Clinical reptile gastroenterology. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 8(2), 277–298. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2005.01.008>

Mitchell, M. A., & Shane, S. M. (2001). *Salmonella* in reptiles. In *Seminars in avian and exotic pet medicine* (Vol. 10, No. 1, pp. 25-35). WB Saunders.

Mott, Rebecca; Pellett, Sarah; Hedley, Joanna (2021). *Prevalence and risk factors for dental disease in captive Central bearded dragons (Pogona vitticeps) in the United Kingdom. Journal of Exotic Pet Medicine*, 36(), 1–7. doi:10.1053/j.jepm.2020.09.002

Muñoz-Ibarra, E., Molina-López, R. A., Durán, I., Garcias, B., Martín, M., & Darwich, L. (2022). Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Exotic Pets: The Situation in the Iberian Peninsula. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(15), 1912. <https://doi.org/10.3390/ani12151912>

O'Rourke, D. P. & Lertpiriyapong, K. (2015). Biology and Diseases of Reptiles. In: J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. R. Pritchett-Corning & M. T. Whary (Eds), *Laboratory Animal Medicine* (3rdEd., pp. 967–1013). Oxford: Elsevier.

Oonincx, D. G., van Leeuwen, J. P., Hendriks, W. H., & van der Poel, A. F. (2015). The diet of free-roaming Australian Central Bearded Dragons (*Pogona vitticeps*). *Zoo biology*, 34(3), 271–277. <https://doi.org/10.1002/zoo.21209>

Ogunleye, A. O., & Carlson, S. (2017). Characterization of a multidrug resistant *Salmonella enterica* give isolated from a lizard captured in a poultry house in Nigeria. *African Journal of Biomedical Research*, 20(1), 53-58.

Philips I.R. Reptiles encountered in practice: A survey of two hundred and forty cases. *J. Small Anim. Pract.* 1986; 27:807–824. doi: 10.1111/j.1748-5827.1986.tb02246.x.

Prezant, R. M., Isaza, R., & Jacobson, E. R. (1994). Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 82-87.

Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>

Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>

Paré, J., Sigler, L., Rosenthal, K. y Mader, D. (2006). Microbiology: fungal and bacterial diseases of reptiles. En D. Mader (Eds.), *Reptile medicine and surgery*, 2nd Ed. (pp. 229–235). St. Louis: Saunders.

Padmavathy, B., Vinoth Kumar, R., Patel, A., Deepika Swarnam, S., Vaidehi, T., & Jaffar Ali, B. M. (2012). Rapid and sensitive detection of major uropathogens in a single-pot multiplex PCR assay. *Current microbiology*, 65(1), 44–53. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0126-3>

Patel, S. H., Bosamia, T. C., Bhalani, H. N., Singh, P., & Kumar, A. (2015). Polymerase chain reaction (PCR). *Agrobios Newsletter: A Monthly Magazine of Agricultural and Biological Sciences (XIII, p. 148)*. *Agrobios newsletter: Magazine of Agricultural and Biological Science*.

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., Threlfall, E. J., Kunsagi, Z., Torren-Edo, J., Jukes, H., & Törneke, K. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(4), 957–968. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>

Pollock, CG. (2018) Understanding reptile dental anatomy: clinical applications. *Lafeber Vet*. Disponível em: <https://lafeber.com/vet/understanding-reptile-dental-anatomyclinical-applications/>. Acedido em 28 de Setembro.

Raftery, A. (2019). Clinical examination. In *BSAVA Manual of Reptiles* (pp. 89-100). BSAVA Library.

Raiti, Paul. (2012). Husbandry, Diseases, and Veterinary Care of the Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 22, 117-131. 10.5818/1529-9651-22.3.117.

Rajalakshmi, S. (2017) Different Types of PCR Techniques and Its Applications. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 7, 285-292.

Rao, M. J., Harle, S., & Padmavathy, M. (2018). Prevalence of extended spectrum beta-lactamases and amp-c beta-lactamases in clinical isolates of gram-negative bacilli at a tertiary care hospital. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, <https://link.gale.com/apps/doc/A559687285/AONE?u=anon~1b34f650&sid=googleScholar&xid=9a9b68f4>

Raphael, B. L., Papich, M., & Cook, R. A. (1994). Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in Indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 88-94.

Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(3), 647–653. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.647>

Raś-Noryńska, M., & Sokół, R. (2015). Internal parasites of reptiles. *Annals of parasitology*, 61(2), 115–117.

Rawat, D., & Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of global infectious diseases*, 2(3), 263–274. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68531>

Reusch, B. (2009). Bearded dragon with periodontal disease: exotic practice challenge. *Veterinary Times*, 39(22), 22-23.

Rom, B., Kornaś, S., & Basiaga, M. (2018). Endoparasites of pet reptiles based on coproscopic methods. *Annals of parasitology*, 64(2), 115–120. <https://doi.org/10.17420/ap6402.142>

Rossolini, G. M., & Mantengoli, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11 Suppl 4, 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x>

Ramos, C. P., Santana, J. A., Morcatti Coura, F., Xavier, R. G. C., Leal, C. A. G., Oliveira Junior, C. A., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Lobato, F. C. F., & Silva, R. O. S. (2019). Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* Spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates

from Reptiles in Brazil. *BioMed research international*, 2019, 9530732. <https://doi.org/10.1155/2019/9530732>

Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria Among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Production. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(12), 2239. <https://doi.org/10.3390/ani10122239>

Richards, A. K., Kue, S., Norris, C. G., & Shariat, N. W. (2023). Genomic and phenotypic characterization of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Microbial genomics*, 9(9), 001089. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001089>

Sakaguchi, K., Nevarez, J. G., & Del Piero, F. (2017). Salmonella Enterica Serovar Pomona Infection in Farmed Juvenile American Alligators (*Alligator Mississippiensis*). *Veterinary pathology*, 54(2), 316–319. <https://doi.org/10.1177/0300985816677149>

Sala, A., Di Ianni, F., Pelizzone, I., Bertocchi, M., Santospirito, D., Rogato, F., ... & Cabassi, C. S. (2019). The prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in healthy captive ophidian. *PeerJ*, 7, e6706. doi: [10.7717/peerj.6706](https://doi.org/10.7717/peerj.6706)

Sandberg, M., Alvseike, O., & Skjerve, E. (2002). The prevalence and dynamics of *Salmonella enterica* IIIb 61: k: 1, 5,(7) in sheep flocks in Norway. *Preventive veterinary medicine*, 52(3-4), 267-275.

Sárosi, I., Gerald, E., & Girish, V. N. (1992). A polimeráz lánc reakció és alkalmazási területei [Polymerase chain reaction and its application]. *Orvosi hetilap*, 133 Suppl 1, 16–21.

Sawatzky, P., Liu, G., Dillon, J. A., Allen, V., Lefebvre, B., Hoang, L., Tyrrell, G., Van Caesele, P., Levett, P., & Martin, I. (2015). Quality Assurance for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria gonorrhoeae* in Canada, 2003 to 2012. *Journal of clinical microbiology*, 53(11), 3646–3649. <https://doi.org/10.1128/JCM.02303-15>

Schröter, M., Roggentin, P., Hofmann, J., Speicher, A., Laufs, R., & Mack, D. (2004). Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 613–615. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.613-615.2004>

Schröter, M., Speicher, A., Hofmann, J., & Roggentin, P. (2006). Analysis of the transmission of *Salmonella* spp. through generations of pet snakes. *Environmental microbiology*, 8(3), 556–559. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00934.x>

Schwendener, S., Nigg, A., Collaud, A., Overesch, G., Kittl, S., Phumthanakorn, N., & Perreten, V. (2019). Typing of *mecD* islands in genetically diverse methicillin-resistant *Macroccoccus caseolyticus* strains from cattle. *Applied and environmental microbiology*, 85(19), e01496-19.

Seixas, R., Pissarra, H., Santos, J., Bernardino, R., Fernandes, T., Correia, J., Vilela, C. L., & Oliveira, M. (2014). Severe fibrinonecrotic enteritis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in a captive

monitor lizard (*Varanus niloticus*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 45(2), 410–412. <https://doi.org/10.1638/2013-0150R1.1>

Simpson, S. (2015). Dragon breath... Periodontal disease in Central Bearded Dragons (*Pogona vitticeps*). In *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians Australasian Committee-Unusual Pet and Avian Veterinarians Combined Conference*.

Songer J.G., Post K.W., (2005). Miscellaneous Coliforms: The Genera *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Citrobacter*. In: J.G.Songer and K.W.Post (Eds.). *Veterinary Microbiology, Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Elsevier Inc. USA, pp. 121-125.

Sörén, K., Lindblad, M., Jernberg, C., Eriksson, E., Melin, L., Wahlström, H., & Lundh, M. (2015). Changes in the risk management of *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* serovar 61:(k):1, 5, (7) in Swedish sheep herds and sheep meat due to the results of a prevalence study 2012. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0096-0>

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 2074–2079. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>

Stahl, S.J. (1999). General husbandry and captive propagation of bearded dragons, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 9 (4): 12–17
Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Stahl, Scott. (2003). Pet lizard conditions and syndromes. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 12. 162-182. 10.1053/saep.2003.00019-7.

Steinman, A., Banet-Noach, C., Tal, S., Levi, O., Simanov, L., Perk, S., Malkinson, M., & Shpigel, N. (2003). West Nile virus infection in crocodiles. *Emerging infectious diseases*, 9(7), 887–889. <https://doi.org/10.3201/eid0907.020816>

Stewart, J. S. (1990). Anaerobic bacterial infections in reptiles. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 180-184.

Stokar-Regenscheit, N., Overesch, G., Giezendanner, R., Roos, S., & Gurtner, C. (2017). *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* serotype 61:k:1,5,(7) associated with chronic proliferative rhinitis and high nasal colonization rates in a flock of Texel sheep in Switzerland. *Preventive veterinary medicine*, 145, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.07.003>

Tauxe, R. V., Rigau-Pérez, J. G., Wells, J. G., & Blake, P. A. (1985). Turtle-associated salmonellosis in Puerto Rico. Hazards of the global turtle trade. *JAMA*, 254(2), 237–239.

Thompson, S.A. and Thompson, G.G. (2003). The western bearded dragon, *Pogona minor* (Squamata: Agamidae): an early lizard coloniser of rehabilitated areas. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 86: 1.

Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards Jr, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., & Bartlett, J. G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 42(5), 657-668.

Tekele, S. G., Teklu, D. S., Tullu, K. D., Birru, S. K., & Legese, M. H. (2020). Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC beta-lactamases producing gram negative bacilli isolated from clinical specimens at International Clinical Laboratories, Addis Ababa, Ethiopia. *PloS one*, 15(11), e0241984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241984>

Unger, F., Eisenberg, T., Prenger-Berninghoff, E., Leidner, U., Ludwig, M. L., Rothe, M., Semmler, T., & Ewers, C. (2017). Imported reptiles as a risk factor for the global distribution of *Escherichia coli* harbouring the colistin resistance gene *mcr-1*. *International journal of antimicrobial agents*, 49(1), 122–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.007>

Vaishnavi, C. (2013). ed. *Infection of the gastrointestinal system*. Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd; New Delhi, India.

Vosik, D., Tewari, D., Dettinger, L., M'ikanatha, N. M., & Shariat, N. W. (2018). CRISPR Typing and Antibiotic Resistance Correlates with Polyphyletic Distribution in Human Isolates of *Salmonella* Kentucky. *Foodborne pathogens and disease*, 15(2), 101–108. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2298>

Valdez J. W. (2021). Using Google Trends to Determine Current, Past, and Future Trends in the Reptile Pet Trade. *Animal: an open access journal from MDPI*, 11(3), 676. <https://doi.org/10.3390/ani11030676>

Vetere, A., Bertocchi, M., Pelizzone, I., Moggia, E., Gerosa, S., & Di Ianni, F. (2021). *Klebsiella* sp.-related infectious spondylitis in a bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *BMC veterinary research*, 17(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02933-7>

Varela, K., Brown, J. A., Lipton, B., Dunn, J., Stanek, D., Behraves, C. B., Chapman, H., Conger, T. H., Vanover, T., Edling, T., Holzbauer, S., Lennox, A. M., Lindquist, S., Loerzel, S., Mehlenbacher, S., Mitchell, M., Murphy, M., Olsen, C. W., & Yager, C. M. (2022). A Review of Zoonotic Disease Threats to Pet Owners: A Compendium of Measures to Prevent Zoonotic Diseases Associated with Non-Traditional Pets: Rodents and Other Small Mammals, Reptiles, Amphibians, Backyard Poultry, and Other Selected Animals. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 22(6), 303–360. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0022>

Woodward, D. L., Khakhria, R., & Johnson, W. M. (1997). Human salmonellosis associated with exotic pets. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2786-2790.

Wotherspoon, A. (2007). Ecology and management of eastern bearded dragon *Pogona barbata* (*Dissertação de mestrado*). University of Western Sydney, Richmond.

Weese, J. S., & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039>

White, G., Ottendorfer, C., Graham, S., & Unnasch, T. R. (2011). Competency of reptiles and amphibians for eastern equine encephalitis virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(3), 421–425. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0006>

Wasył, D., & Hoszowski, A. (2012). First isolation of ESBL-producing *Salmonella* and emergence of multiresistant *Salmonella* Kentucky in turkey in Poland. *Food Research International*, 45(2), 958-961. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.024>

Wheeler, E., Hong, P. Y., Bedon, L. C., & Mackie, R. I. (2012). Carriage of antibiotic-resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), 56-67.

WHO (2016). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.

Wilkinson, S. L. (2016). Dental disease in common pet reptiles. In *Proceedings of the North American Veterinary Conference. Small animal and exotics. Orlando, USA* (pp. 1546-154).

Wolf, C., & Schefers, J. (2017). Challenges posed by a flock problem of *Salmonella* diarizonae induced proliferative rhinitis. In *Proceedings of the 9th International Sheep Veterinary Congress* (pp. 22-26).

Xiong, Y., Wu, Q., Qin, X., Yang, C., Luo, S., He, J., Cheng, Q., & Wu, Z. (2022). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* From the Skin Ulcer Disease of Crocodile Lizards (*Shinisaurus crocodilurus*) and Probiotics as the Control Measure. *Frontiers in veterinary science*, 9, 850684. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.850684>

Yang, Y. J., Wu, P. J., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(5), 755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.755>

Zajac, M., Wasył, D., Hoszowski, A., Le Hello, S., & Szulowski, K. (2013). Genetic lineages of *Salmonella enterica* serovar Kentucky spreading in pet reptiles. *Veterinary microbiology*, 166(3-4), 686–689. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.023>

Zajac, M., Skarżyńska, M., Lalak, A., Kwit, R., Śmiałowska-Węglińska, A., Pasim, P., Szulowski, K., & Wasył, D. (2021). *Salmonella* in Captive Reptiles and Their Environment-Can We Tame the Dragon? *Microorganisms*, 9(5), 1012. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051012>

Zancolli, G., Mahsberg, D., Sickel, W., & Keller, A. (2015). Reptiles as reservoirs of bacterial infections: real threat or methodological bias. *Microbial ecology*, 70, 579-584.

Zhang, P. L. C., Shen, X., Chalmers, G., Reid-Smith, R. J., Slavic, D., Dick, H., & Boerlin, P. (2018). Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal Enterobacteriaceae isolates from dogs in Ontario, Canada. *Veterinary microbiology*, 213, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.020>

Zhou, M., Shi, Q., Zhang, X., Mei, L., Ye, Y., Fang, C., & Shang, S. (2021). *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* Harboring ST233, ST1263, and ST1845 in Children. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 727811. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.727811>