

MAFALDA RAMALHAL AFONSO SILVA

**AVALIAÇÃO DA FLORA ORAL BACTERIANA
CULTIVÁVEL DE PITONS REAIS (*PYTHON REGIUS*)**

Orientador: Prof. Doutor Eduardo Marcelino
Co-Orientador: Dr. Rui Patrício

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia
Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2022**

MAFALDA RAMALHAL AFONSO SILVA

**AVALIAÇÃO DA FLORA ORAL BACTERIANA
CULTIVÁVEL DE PITONS REAIS (*PYTHON REGIUS*)**

Dissertação defendida em prova pública para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 2 de junho de 2022, com o Despacho de Nomeação de Júri Nº 214/2022, de 20 de maio de 2022, com a composição seguinte:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Faísca

Arguente: Prof^a. Doutora Andreia Valença

Orientador: Prof. Doutor Eduardo Marcelino

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia

Faculdade de Medicina Veterinária

**Lisboa
2022**

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é o momento de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, pelos seus docentes dedicados e aprendizagem proporcionada, através de excelentes conteúdos programáticos e condições proporcionadas.

À Dra. Laurentina Pedroso, diretora da Faculdade de Medicina Veterinária, pelo seu apoio incondicional a todos os estudantes e por todo o seu esforço contínuo para proporcionar aos seus estudantes, os melhores conteúdos e métodos de aprendizagem.

Ao orientador, Dr. Eduardo Marcelino, e ao co-orientador, Dr. Rui Patrício, pelo apoio, disponibilidade e orientação, partilhando comigo os seus conhecimentos, que tornaram possível a realização deste trabalho.

À DNAtch e ao seu staff por toda a disponibilidade e atenção, o que permitiu a realização deste estudo.

Ao Hospital Veterinário Vasco da Gama, a toda as pessoas que conheci e com quem tive a oportunidade de trabalhar, estando sempre disponíveis para me ensinarem.

Ao João Antunes, por disponibilizar os seus animais para a realização deste estudo, e por toda a sua disponibilidade, paciência e simpatia.

Aos amigos de curso, Alexandra e Gonçalo, pelo seu apoio e ajuda incondicional, e amizade durante a realização deste curso.

Aos amigos e namorado, que apareceram ao longo da minha vida e se mantiveram presentes, demonstrando sempre o seu apoio, carinho e amizade.

À minha família, pela paciência, força e apoio que me deram durante a realização deste curso, tal como o apoio económico que me forneceram, sempre ensinando a ser uma melhor pessoa durante os meus estudos.

Resumo

A flora oral dos répteis está associada à presença de bactérias patogénicas oportunistas e zoonóticas. Com o aumento da procura de pitons reais (*Python regius*) como animais de estimação, há também um aumento da sua presença em clínica por doenças bacterianas, e do seu contacto com humanos, aumentando também a possibilidade de agressão e transmissão destas bactérias.

Pretende-se, com o presente estudo, identificar as bactérias aeróbias cultiváveis da cavidade oral de pitons reais saudáveis. Para tal, procedeu-se à recolha de amostras da cavidade oral com zaragatoas estéreis e, cultivo bacteriano em diferentes meios e identificação, das mesmas, por método bioquímico com sistema automatizado Vitek.

No estudo foi observada uma grande variedade de bactérias, tendo sido isoladas um total de 13 espécies bacterianas, seis Gram-positivas, das quais cinco foram identificadas com sucesso como *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri* e *Micrococcus luteus*, e sete Gram-negativas, nomeadamente, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Concluiu-se que há uma grande variedade de bactérias aeróbias na flora oral destes animais, sendo muitas patogénicas oportunistas ou, tendo potencial zoonótico, com importância relevante para a saúde pública.

Palavras-chave: flora oral, bactéria aeróbia, *Python regius*

Abstract

Reptiles oral flora is associated with zoonotic and pathogenic opportunistic bacteria. The search for ball pythons (*Python regius*) to be kept as pets, makes more common the presence of these animals in clinic, and the contact between these animals and humans, increasing the possibility of aggression and transmission bacteria.

The objective of this study was to identify aerobic bacteria from the oral cavity of healthy ball pythons. For that, a sterile swab was used to collect samples from the oral cavity of these animals and bacterial cultures were performed followed by the identification by biochemical method using automated Vitek system.

In this study a variety of bacteria was isolated, with a total of 13 bacterial species, six of them Gram-positive, with five correctly identified, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri* and *Micrococcus luteus*, and seven Gram-negative, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.

We concluded that the oral flora of these animals is constituted by a variety of bacteria, most of them being zoonotic and opportunistic pathogens, having a great importance in public health.

Keywords: oral flora, aerobic bacteria, *Python regius*

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

F – fêmeas

M – machos

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

HVVG – Hospital Veterinário Vasco da Gama

AST – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos, do inglês “Antimicrobial Susceptibility Testing”

BHI – Caldo Coração-Cérebro, do inglês “Brain-Heart Infusion”

TSA – Meio de Soja Trypticase, do inglês “Tryptic Soy Agar”

TPY – Trypticase-Fitona-Extrato de Levedura, do inglês “Trypticase-Phytone-Yeast Extract”

BHI-T – Caldo Coração-Cérebro com Tiamina, do inglês “Brain-Heart Infusion with Thiamine”

CNA – Ácido nalidíxico Columbia, do inglês “Columbia Nalidixic Acid”

MCK – MacConkey

CPSE – CPS Elite

PVX – PolyViteX

Índice

Capítulo I – Casuística de estágio	12
Capítulo II – Avaliação da flora oral bacteriana cultivável de pitons reais.....	15
1. Piton real	16
1.2. Anatomia da cavidade oral	17
1.2.1. Testudines.....	17
1.2.2. Squamata.....	18
1.2.2.1. Serpentes	18
1.2.2.2. Lagartos.....	20
1.2.3. Crocodilya	21
1.2.4. Rhynchocephalia	22
1.3. Saúde dos répteis em cativeiro.....	23
1.3.1. Estomatite bacteriana.....	23
1.3.1.1. Diagnóstico	24
1.3.1.2. Terapêutica	25
1.3.2. Patologias por mordedura	26
1.3.3. Potencial patogénico e zoonótico	26
1.3.4. Prevenção da transmissão	27
1.4. Flora bacteriana residente	28
1.4.1. Enterobacter	29
1.4.2. Pseudomonas.....	30
1.4.3. Staphylococcus.....	30
1.4.4. Salmonella.....	30
1.4.5. Aeromonas	31
1.4.6. Escherichia coli.....	31
1.4.7. Stenotrophomonas maltophila.....	31
1.4.8. Morganella.....	32
1.4.9. Enterococcus.....	32
1.5. Resistência a antimicrobianos	32
1.6. A Importância da caracterização da flora residente.....	33
1.7. Objetivos	34
2. Material e métodos	35
2.1. Amostra do estudo.....	35

2.2. Colheita das zaragatoas orais	35
2.3. Análise laboratorial	36
3. Resultados	37
4. Discussão	41
5. Conclusão	46
Bibliografia.....	47
Anexo	I

Índice de tabelas

Tabela 1. Dados obtidos de cada exemplar (Feminino (F) , Masculino (M)).....	38
Tabela 2. Frequência das espécies isoladas no estudo.....	40

Índice de figuras

Figura 1. Exemplos de quelônios: A) <i>Podocnemis unifilis</i> ; B) Mata-mata (<i>Chelus fimbriata</i>); C) Tartaruga nariz de porco (<i>Carettochelys insculpta</i>) (Boyer & Innis, 2019).....	15
Figura 2. A) Exemplar de tuatara: <i>Sphenodon punctatus</i> (Alexander, 2019); B) Exemplar de crocodilo: Crocodilo-persa (<i>Crocodylus palustris</i>) (Durso & Maerz, 2019).	15
Figura 3. A) Exemplar de cobra: Boa constritora (<i>Boa constrictor</i>) (Funk & Bogan Junior, 2019); B) Exemplar de lagarto: Iguana verde (<i>Iguana iguana</i>) (Barten & Simpson, 2019).....	15
Figura 4. Cavidade oral saudável num quelônio, sendo possível observar a ranfoteca e a língua (Hedley, 2016).....	18
Figura 5. A) Deformação da ranfoteca numa tartaruga de caixa (<i>Terrapene</i>), deveria ser completamente vertical; B) Deformação da ranfoteca devido a mau manejo nutricional (Boyer & Innis, 2019).....	18
Figura 6. Dentição de uma cobra do milho (<i>Pantherophis guttatus</i>) mostrando a arcada extra de dentes (setas apontam para a arcada esquerda) (Hedley, 2016).....	19
Figura 7. Diferentes tipos de dentição: A) Tecodontes; B) Pleurodontes; C) Acrodontes (Mitchell, 2009).	19
Figura 8. A) A dentição pleurodonte de uma iguana verde (<i>Iguana iguana</i>) B) Doença periodontal na arcada maxilar esquerda de um dragão barbudo (<i>Pogona vitticeps</i>) (Barten & Simpson, 2019).....	21
Figura 9. Cavidade oral saudável de um crocodilo americano (<i>Crocodylus acutus</i>) mostrando os dentes cónicos destes (Hedley, 2016).....	22
Figura 10. Dentição maxilar de uma tuatara juvenil (<i>Sphenodon</i>): A) Fileira dentária localizada no osso maxilar; B) Fileira dentária localizada no osso palatino; C) Dentes tipo incisivos na pre-maxila (Evans, 2008).	22
Figura 11. A) Estomatite severa em boa constritor (<i>Constrictor Constrictor</i>) (Mehler & Bennett, 2003) B) Estomatite ligeira numa boa de cauda vermelha (<i>Boa constrictor</i>) setas assinalam o local da lesão (Hedley, 2016) C) Estomatite severa purulenta difusa numa tartaruga-de-barriga-amarela (<i>Trachemys scripta scripta</i>) (De Voe, 2019).....	24
Figura 12. Pesagem dos exemplares.....	35
Figura 13. Recolha das amostras.	36
Figura 14. Diferentes resultados de cultura: A) <i>Acinetobacter</i> ; B) <i>Pseudomonas</i> e <i>Enterobacter</i> ; C) <i>Aeromonas</i>	36
Figura 15. A) e B) Cultura da bactéria gram + não identificada.	37

Figura 16. Detalhes bioquímicos da bactéria gram + não identificada (Anexo 1). 37

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Casuística de animais acompanhados em consulta durante o estágio no HVVG.....	11
Gráfico 2 . Casuística clínica observada durante o estágio no HVVG.....	12
Gráfico 3. Casuística de patologia médica durante o estágio no HVVG.....	12
Gráfico 4. Casuística de patologias cirúrgicas acompanhadas durante o estágio no HVVG.....	13
Gráfico 5. Casuística de exames complementares realizadas durante o estágio no HVVG.....	13

Capítulo I – Casuística de estágio

O estágio curricular, realizado no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, foi realizado entre outubro de 2020 e fevereiro de 2021, no Hospital Veterinário Vasco da Gama (HVVG), sob orientação do Doutor Bruno Oliveira. No estágio, fazia rotações semanais, incluindo fins de-semana e noites quinzenalmente, acompanhando e auxiliando em consultas, cirurgias, anestesia e internamento.

Foi possível acompanhar diversos médicos veterinários, tendo consultas com diferentes espécies como cães, gatos, aves e coelhos (Gráfico 1), e em diversas áreas de especialidade, tais como medicina preventiva, neurologia, ortopedia, cardiologia, urologia, nefrologia, endocrinologia, dermatologia, oftalmologia, oncologia, gastroenterologia, exóticos, doenças infecciosas, odontologia, reprodução e neonatologia (Gráfico 2).

Também foi possível ajudar enfermeiros e auxiliares veterinários, nos cuidados dos animais no internamento. Tendo sido possível recolher amostras de sangue e processá-las no laboratório, processar amostras de urina e citologias no laboratório, colocar cateteres, administrar vacinas e medicações subcutâneas, intramusculares, intravenosas e orais (Gráfico 3). Tive, também a oportunidades, de auxiliar na preparação cirúrgica, na cirurgia como segundo cirurgião ou circulante e no recobro (Gráfico 4). Tal como nos exames complementares, incluindo radiografias, ecografias, ecocardiografias, colonoscopias, uretroscopias e tomografias computadorizadas (Gráfico 5).



Gráfico 1. Casuística de animais acompanhados em consulta durante o estágio no HVVG.

Casuística clínica

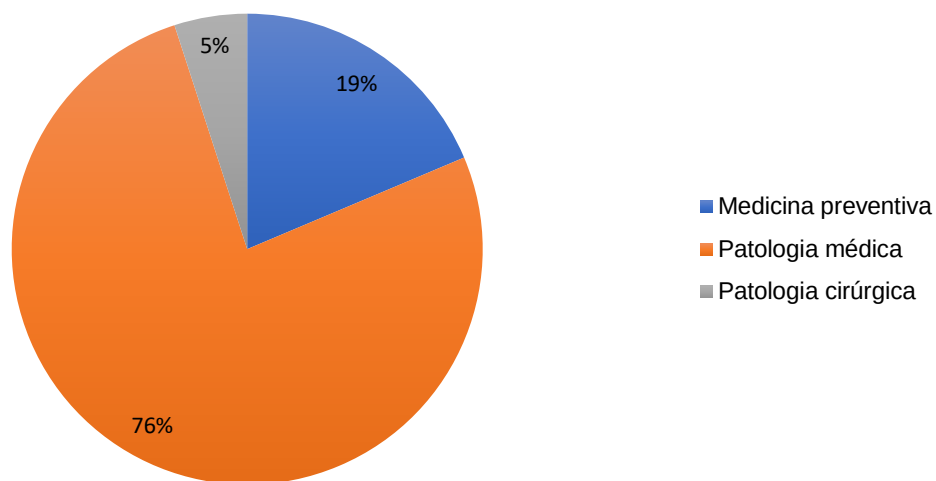


Gráfico 2. Casuística clínica observada durante o estágio no HVVG.

Patologia médica

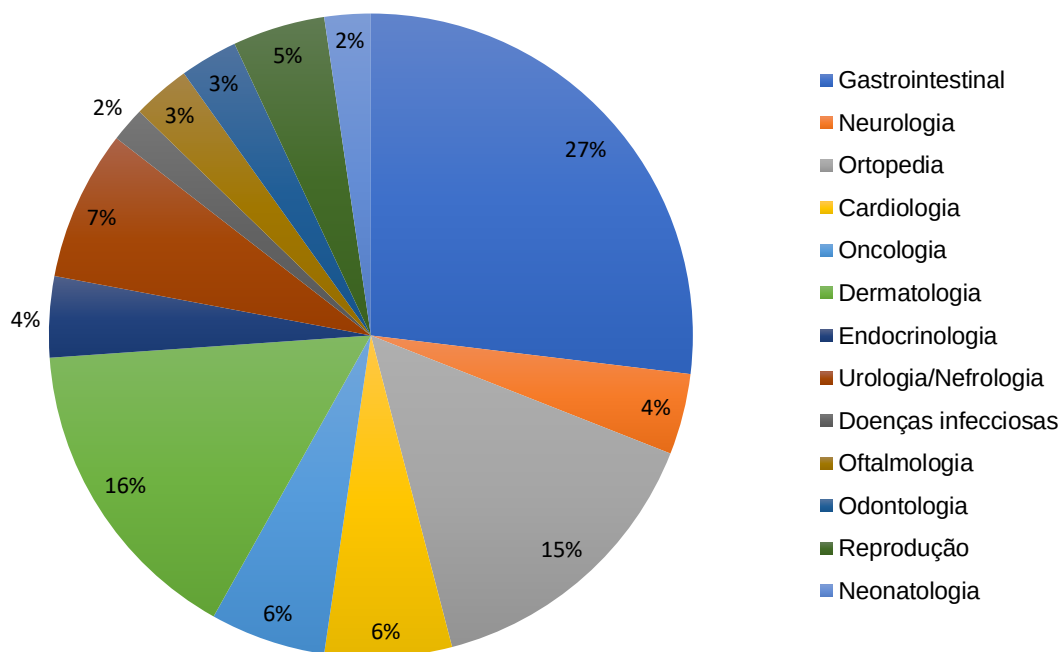


Gráfico 3. Casuística de patologia médica durante o estágio no HVVG.

Patologia Cirúrgica

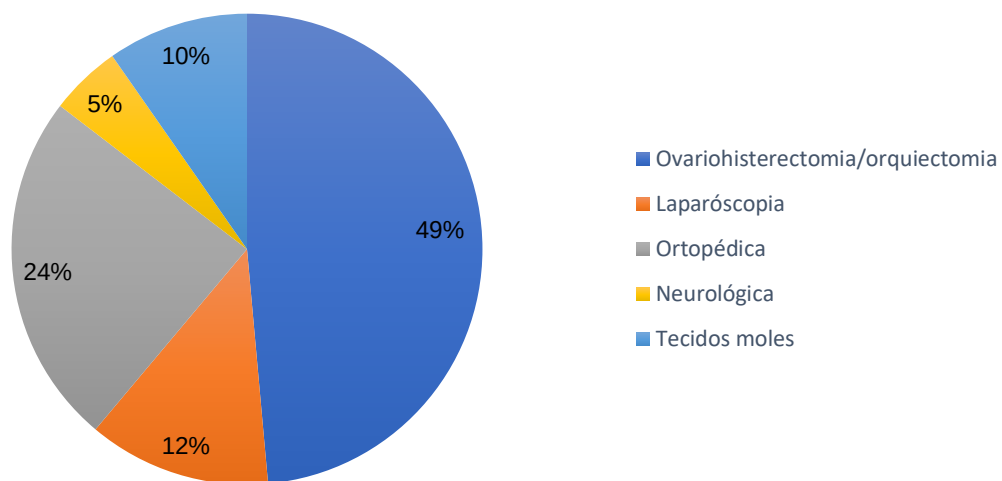


Gráfico 4. Casuística de patologias cirúrgicas acompanhadas durante o estágio no HVVG.

Exames complementares

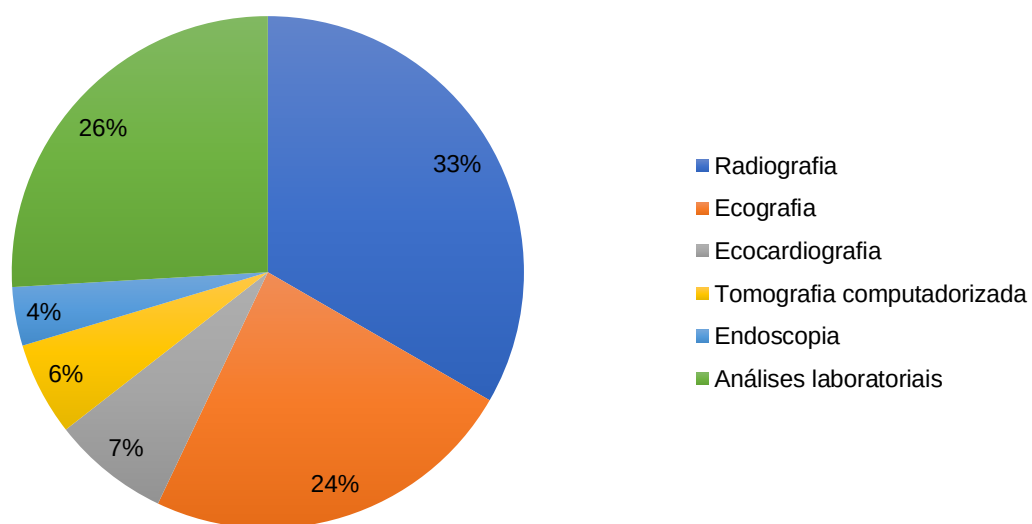


Gráfico 5. Casuística de exames complementares realizadas durante o estágio no HVVG.

Capítulo II – Avaliação da flora oral bacteriana cultivável de pitons reais

Os répteis atuais (classe Reptilia) dividem-se em quatro ordens, a ordem Testudines, que engloba todas as espécies de tartarugas (figura 1), a Crocodylia, que agrupam os crocodilos (figura 2A) e jacarés, a Rhynchocephalia, que contém apenas as tuataras (figura 2B) e a ordem Squamata, que inclui os lagartos (figura 3A) e as cobras (Serpentes) (figura 3B) (Doneley et al., 2018). Os animais das ordens Testudines e Crocodylia, apesar de se encontrarem geograficamente dispersos, não estão presentes em habitat frios, ao contrário das espécies da ordem Squamata, que conseguiram prevalecer em ambientes frios (Pincheira-Donoso et al., 2013). Rhynchocephalia está limitada geograficamente, existindo apenas em ilhas localizadas em redor da Nova Zelândia (Hay et al., 2010).

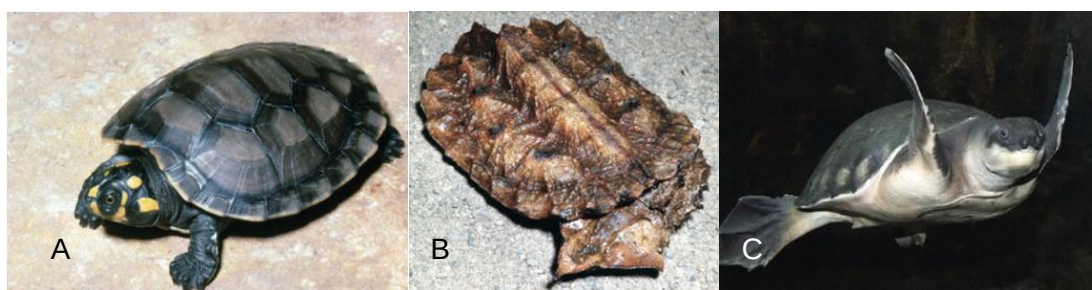


Figura 1. Exemplos de quelônios: A) *Podocnemis unifilis*; B) Mata-mata (*Chelus fimbriata*); C) Tartaruga nariz de porco (*Carettochelys insculpa*) (Boyer & Innis, 2019).

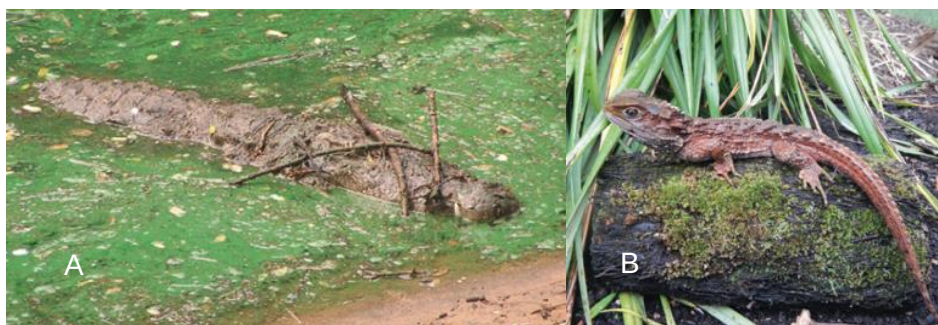


Figura 2. A) Exemplar de crocodilo: Crocodilo-persa (*Crocodylus palustris*) (Durso & Maerz, 2019); B) Exemplar de tuatara: *Sphenodon punctatus* (Alexander, 2019).

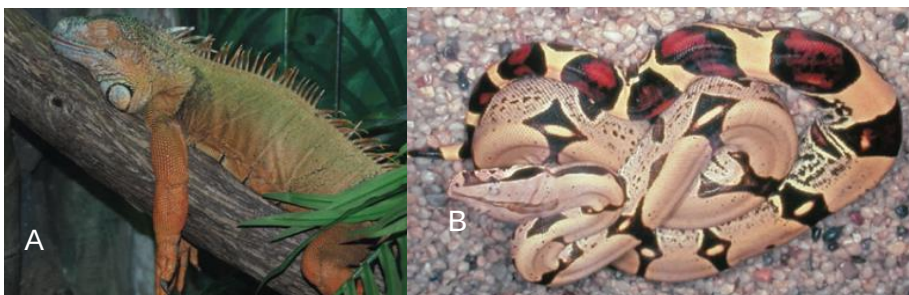


Figura 3. A) Exemplar de lagarto: Iguana verde (*Iguana iguana*) (Barten & Simpson, 2019). B) Exemplar de cobra: Boa constritora (*Boa constrictor*) (Funk & Bogan Junior, 2019)

1. Piton real

As pitons reais pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, sub-filo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Serpentes, família Pythonidae, género *Python*, espécie *Python regius* (Babalola & Balogun, 2013).

Estas são cobras não venenosas e, a sua distribuição geográfica engloba o Oeste subsaariano e África Central, encontrando-se até o Uganda (Toudonou, 2015). É a mais pequena das espécies africanas, não crescendo mais do que 90 a 120cm em comprimento, sendo que as fêmeas tendem a ser maiores que os machos. O seu corpo é entroncado com uma cabeça pequena, as suas escamas são macias e ambos os sexos possuem esporas pélvicas em ambos os lados da cloaca. A sua cor natural é constituída por padrões de cor preta ou castanha escura, com os contornos de cor castanha clara ou dourada. A sua barriga é de cor branca ou um castanho muito claro, com pequenas marcas pretas ao longo desta (Babalola & Balogun, 2013). É conhecida pelo seu método de defesa, no qual se enrola numa bola protegendo a cabeça e pescoço no centro, o que originou um outro nome pelo qual é conhecida, piton bola (Babalola & Balogun, 2013).

Os seus habitats variam, sendo encontrada em savanas, florestas abertas, matagais ou pastagens, vivendo em ambientes com temperatura entre os 16° C e os 43° C, e com humidade relativa muito variável, desde os 50% aos 80%, dependendo tratar-se de estação seca ou de chuva (Babalola & Balogun, 2013; Hollandt et al., 2021).

As pitons reais são um dos répteis mais comuns mantidos em cativeiro como animal de estimação, sendo, por isso, dos mais traficados mundialmente. Esta elevada procura está associada às suas diversas colorações, havendo criadores e tutores à procura de cores mais raras. Mas a popularidade desta espécie deve-se à sua natureza mais dócil, pequenas dimensões e a uma grande longevidade, sendo, por isso, animais fáceis de se manter em cativeiro e considerados ideais como primeiro réptil de estimação para um tutor inexperiente (Green et al., 2020).

Manter estes animais em cativeiro exige cuidados especiais, como um espaço próprio, com iluminação, temperatura e humidade controladas, uma alimentação ajustada, assim como uma higiene do espaço e do animal adequadas. É frequente os tutores não estarem devidamente informados quanto às necessidades específicas desta espécie e, por vezes, os próprios locais de venda também não os mantêm em condições ideais, podendo assim o animal viver anos em condições desajustadas (Green et al., 2020). O estudo de Hollandt e colaboradores (2021), que comparou animais a viverem em sistema de gavetas e em terrários, em condições de temperatura e humidade controladas, concluiu que o sistema de gavetas leva a uma restrição considerável dos comportamentos naturais da espécie, com

manifestações de comportamentos anormais ou estereotipados, sendo o terrário o modo de alojamento mais apropriado, pois permite que o animal se exponha à luz, trepe, se enterre e tome banho. A dimensão do terrário deve ser proporcional ao tamanho do animal, com substrato adequado à necessidade de se enterrar, com esconderijos e locais para trepar e, obrigatoriamente, com uma fonte de água e um local para tomar banho (Hollandt et al., 2021). A temperatura deve estar, idealmente, entre os 20°C e os 30°C (sendo que, em época de reprodução, a temperatura ideal para as fêmeas é de 31,5°C), e a humidade relativa entre os 50% e os 80% de humidade, sendo atualmente estes parâmetros facilmente e automaticamente controlados com os acessórios atuais para os terrários (Hedley & Eatwell, 2013; Hollandt et al., 2021).

Ainda com alguma frequência nos dias de hoje, os vendedores não providenciam a informação necessária aos novos tutores para a manutenção ideal destes animais e dos cuidados a ter, o que pode conduzir a problemas de saúde e bem-estar nos animais, tais como lesões devido a trauma, comportamentos anormais, relacionados com stress, malnutrição ou infeções microbianas, podendo culminar com a morte do animal. Estes problemas de saúde não são os únicos, pois, com a procura de cores exóticas nesta espécie, há um aumento da consanguinidade (Green et al., 2020).

As pitons reais, muitas vezes, provêm de quintas, locais onde os ovos são retirados da natureza, nascem em cativeiro, sendo uma percentagem destes devolvida ao habitat natural e outra criada na quinta para comércio. Frequentemente, nestas quintas, há um excesso populacional, poucos cuidados de higiene e um maneio deficiente, o que pode originar patologias diversas, sofrimento, competição por necessidades vitais, como água, e agressão por outros animais do recinto. De um modo semelhante, o transporte destes animais, muitas vezes para outros continentes, pode levantar os mesmos problemas (Green et al., 2020).

1.2. Anatomia da cavidade oral

1.2.1. Testudines

Os Testudines, vulgarmente designados por quelónios, não têm dentes, mas sim ranfotecas ou bicos. Estes têm a função de rasgar o alimento, sendo este ingerido em pedaços (Hedley, 2016; Boyer & Innis, 2019; Krichgessner & Mitchell, 2009). Apresentam uma língua carnuda, curta e não distensível, ao contrário dos Squamata (figura 4) (Hedley, 2016; Boyer & Innis, 2019).

Muitos quelónios herbívoros possuem cristas no palato que facilitam preensão e a fragmentação do alimento (Hedley, 2016).

Em cativeiro, são comuns as deformações das ranfotecas, devido a deficiências nutricionais e alimentares (figura 5) (Boyer & Innis, 2019).



Figura 4. Cavidade oral saudável num quelônio, sendo possível observar a ranfoteca e a língua (Hedley, 2016).



Figura 5. A) Deformação da ranfoteca numa tartaruga de caixa (*Terrapene*), deveria ser completamente vertical; B) Deformação da ranfoteca devido a mau manejo nutricional (Boyer & Innis, 2019).

1.2.2. Squamata

1.2.2.1. Serpentes

As serpentes apresentam normalmente seis fileiras de dentes, duas inferiores (uma em cada um dos ossos da mandíbula) e quatro superiores (uma em cada osso maxilar e outra em cada osso palatino ou pterigoide), podendo haver espécies com uma arcada de dentes maxilares extra, localizadas no palato (figura 6). Os dentes são todos semelhantes e apresentam uma forma alongada, fina, pontiaguda e ligeiramente encurvados posteriormente. Estes animais são assim classificados como homodontes, pois não existe diferenciação em incisivos, pré-molares ou molares. Contudo, nas espécies venenosas, existe a diferenciação

de alguns dentes maxilares em presas. Toda a dentição é pleurodonte e poliafiódonte, ou seja, os dentes não estão implantados em alvéolos dentários e vão sendo continuamente substituídos ao longo da vida do animal (figura 7B) (Hedley, 2016; Funk & Bogan Junior, 2019; Mitchell, 2009).

A língua é fina, longa e tem a ponta bifurcada. Encontra-se sob a epiglote e a sua função está relacionada com o olfato, conduzindo as partículas de odor para o órgão vomeronasal (ou de Jacobson) localizados no palato. Animais que perdem a língua por trauma, podem deixar de comer, pois deixam de ter a capacidade de detetar as presas através do seu olfato (Hedley, 2016; Funk & Bogan Junior, 2019; Mitchell, 2009).



Figura 6. Dentição de uma cobra do milho (*Pantherophis guttatus*) mostrando a arcada extra de dentes (setas apontam para a arcada esquerda) (Hedley, 2016).

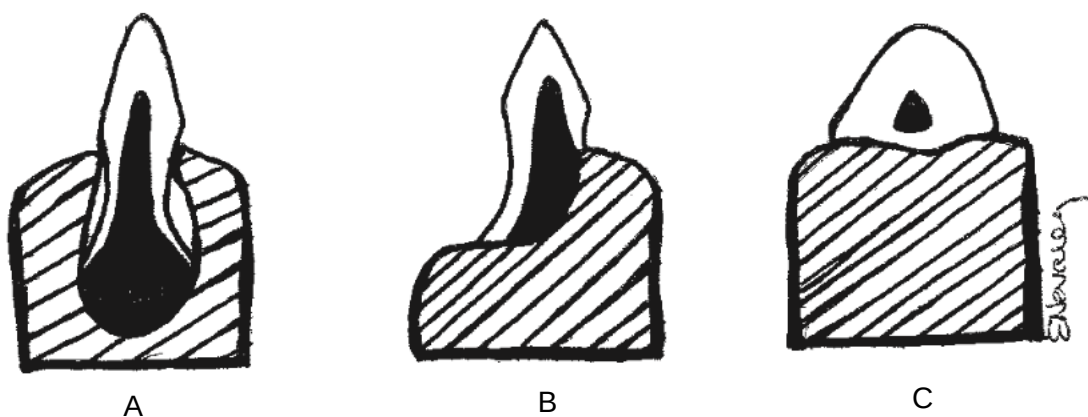


Figura 7. Diferentes tipos de dentição: A) Tecodontes; B) Pleurodontes; C) Acrodontes (Mitchell, 2009).

1.2.2.2. Lagartos

Os dentes dos lagartos estão divididos em dois tipos, pleurodontes e acrodontes (figura 7B e C). Os primeiros, encontrados nos varanídeos e iguanas, têm raízes com fracas ligações ao osso mandibular, não têm alvéolos dentários, estão posicionados na face lingual dos ossos da mandíbula, e vão sendo substituídos ao longo da vida do animal. Estes dentes caem desfasadamente, permitindo sempre a existência de dois dentes funcionais entre o espaço criado pela queda de outro (figura 8A). Isto é importante pois estes animais, ao contrário das cobras e quelônios, mastigam o seu alimento antes de o ingerirem (Hedley, 2016; Barten & Simpson, 2019; Mitchell, 2009). No segundo tipo, encontrado nos camaleões e agamídeos, têm raízes curtas, também sem alvéolos dentários e fundidos com o próprio osso mas, ao contrário dos anteriores, estão posicionados no bordo dorsal da mandíbula. Estes dentes não são substituídos, exceto em animais muito jovens, apesar de poder haver o crescimento de novos dentes, no posterior das fileiras, conforme o crescimento do animal (Hedley, 2016; Barten & Simpson, 2019; Mitchell, 2009).

Animais com dentição acrodonte aparecem, frequentemente, em clínica com doenças periodontais, comum, por exemplo, em dragões barbudos (*Pogona vitticeps*) (figura 8B) devido ao mau manejo alimentar, por alimentação excessiva com frutos moles ou traças-de-cera, o que promove o desenvolvimento de placa e colónias bacterianas, com consequente gengivite e formação de cálculos (Hedley, 2016).

Os lagartos do Caimão do Norte (*Dracaena guianensis*) e Varanos do nilo (*Varanus niloticus*) adultos, ambos com uma alimentação à base de moluscos, possuem dentes molares largos e arredondados para partir as conchas (Hedley, 2016; Barten & Simpson, 2019).

Normalmente, os lagartos têm uma língua móvel com a sua raiz conectada ao aparelho hióide, podendo ser mais carnuda ou mais similar à das cobras, com a mesma função de direccionar odores para o órgão vomeronasal (Hedley, 2016; Barten & Simpson, 2019; Mitchell, 2009). Considerando a anatomia da língua dos camaleões, estes podem aparecer em clínica devido a lesões relacionadas com este órgão (Barten & Simpson, 2019; Mitchell, 2009)

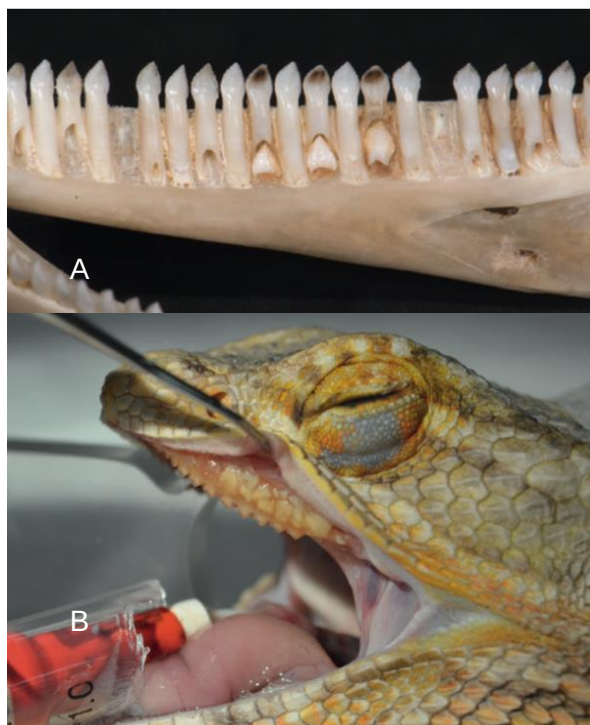


Figura 8. A) A dentição pleurodonte de uma iguana verde (*Iguana iguana*); B) Doença periodontal na arcada maxilar esquerda de um dragão barbudo (*Pogona vitticeps*) (Barten & Simpson, 2019).

1.2.3. Crocodylia

Os animais da ordem Crocodylia são polifiodontes, ou seja, durante a sua vida, os dentes vão sendo substituídos, estimado que tal aconteça cerca de 50 vezes durante este tempo. A substituição de certos dentes pode deixar de acontecer em animais geriátricos ou devido a trauma que os possa afetar. Têm uma dentição tecodonte, ou seja, os seus dentes estão em alvéolos, têm uma forma cônica, são ocos e sem raízes (figura 7A e figura 9) (Hedley, 2016; Nevarez, 2019). A sua dentição pode ter disposições diferentes, e a doença periodontal não tem significância clínica nestes animais (Nevarez, 2019).

A língua dos crocodilos não tem a disposição anatómica que permita a profusão deste órgão, pois encontra-se conectado a toda a superfície ventral da boca (Nevarez, 2019).



Figura 9. Cavidade oral saudável de um crocodilo americano (*Crocodylus acutus*) mostrando os dentes cónicos deste (Hedley, 2016).

1.2.4. Rhynchocephalia

Os animais da ordem Rhynchocephalia têm dentições acrodontes (figura 7C), apresentando duas fileiras de dentes na parte superior da cavidade oral, uma exterior encontra-se localizada no osso maxilar, e outra fileira interior, mais curta, conectada à extremidade lateral do osso palatino (figura 10). A mandíbula tem apenas uma fileira de dentes, que encaixa entre as duas fileiras superiores, originando uma mordida poderosa, que permite serrar o alimento. Apresentam ainda dois dentes largos, similares a incisivos, na parte rostral da maxila, mais precisamente na pre-maxila, e, como nos lagartos, o número de dentes vai aumentando ao longo do seu crescimento, os quais crescem caudalmente às fileiras da maxila (Alexander, 2019).

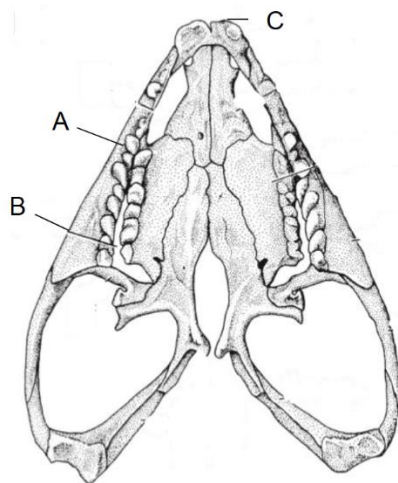


Figura 10. Dentição maxilar de uma tuatara juvenil (*Sphenodon*): A) Fileira dentária localizada no osso maxilar; B) Fileira dentária localizada no osso palatino; C) Dentes tipo incisivos na pre-maxila (a adaptado de: Evans, 2008).

1.3. Saúde dos répteis em cativeiro

A saúde destes animais em cativeiro é importante para o seu bem-estar, sendo a identificação de doenças contagiosas importante, também, devido ao seu potencial zoonótico, podendo ser transmissíveis por contacto direto ou por mordedura. Em casos de mordeduras entre répteis, ou entre o réptil e o seu tutor, podem ocorrer infeções microbianas, possivelmente causadas por bactérias residentes da flora oral do animal agressor (Babalola & Balogun, 2013; Cushing et al., 2011).

As doenças na cavidade oral de répteis em cativeiro, possuem, normalmente, etiologia bacteriana, as quais podem ocorrer secundariamente a mau manejo alimentar e ambiental. Estas doenças podem ser causadas pelas bactérias comensais da sua cavidade oral, devido a serem maioritariamente espécies bacterianas patogénicas oportunistas (Babalola & Balogun, 2013; Cushing et al., 2011).

Quanto ao manejo ambiental do animal, um estudo diferenciou cobras em cativeiro isoladas em caixas, com controlo de temperatura e de humidade, de outras mantidas em grupos numa sala com parte coberta e parte exposta ao ar livre, concluindo-se que, os animais com acesso ao ar livre, apresentavam uma melhor saúde oral do que os isolados. A variedade de flora oral em animais mantidos em cativeiro isolado pode ser explicada pela sua dieta e através da contaminação da sua fonte de água, com as suas fezes, enquanto as que se encontram em ambiente exterior estão menos expostas a este problema, devido à facilidade de higienização do local (Ferreira et al., 2010).

1.3.1. Estomatite bacteriana

As estomatites são comuns em répteis em cativeiro, frequentemente secundárias a imunossupressão causada por mau manejo ambiental ou alimentar, tais como temperatura inapropriada, hibernação inadequada ou défices nutricionais. Podem também estar presentes, em casos de trauma ou neoplasia, ou outras doenças concomitantes, como doença renal. Os sinais clínicos podem ser variados como anorexia, disfagia, paralisia da língua, gengivites, equimoses, petéquias e/ou perda de dentes. Quando não tratadas atempadamente, as estomatites podem progredir e originar osteomielites, problemas no trato respiratório ou mesmo septicémia e morte (Hedley, 2016; Mehler & Bennett, 2003).

A cavidade oral dos répteis é colonizada por diversas espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias, tanto gram-positivas como gram-negativas. Em estomatites bacterianas, é comum identificar-se um sobre-crescimento de bactérias gram-negativas, que podem

provocar septicemia e abscessos em répteis, sendo estas as que causam maior morbidade e mortalidade nestes animais. As bactérias mais frequentemente isoladas são *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. e *Mycobacterium* spp. (Hedley, 2016; Jho et al., 2011; Mehler & Bennett, 2003; Mitchell & Diaz-Figueroa, 2005). Por vezes, também podem ser isoladas bactérias anaeróbias do género *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* (Hedley, 2016).

Algumas espécies bacterianas tendem a ser mais comuns em estomatites com lesões específicas, tal como *Pseudomonas* spp. em estomatites ulcerativas ou *Mycobacterium* spp. em casos de estomatites crónicas granulomatosas e não granulomatosas. Em lagartos, é mais comum identificar-se *Aeromonas* spp. como causa da estomatite (Mehler & Bennett, 2003).



Figura 11. A) Estomatite severa em boa constritora (*Boa constrictor*) (Mehler & Bennett, 2003); B) Estomatite ligeira numa boa constritora (*Boa constrictor*) setas assinalam o local da lesão (Hedley, 2016); C) Estomatite severa purulenta difusa numa tartaruga-de-barriga-amarela (*Trachemys scripta scripta*) (De Voe, 2019).

1.3.1.1. Diagnóstico

Para a identificação do agente etiológico, é necessário colher uma amostra das lesões para realizar cultura microbiológica e teste de sensibilidade a antimicrobianos (AST) (McVey, 2013). Para melhor se avaliar a extensão da lesão e realizar uma recolha correta, poderá ser conveniente anestesiá-lo animal (Hedley et al., 2021). Para a cultura de bactérias aeróbias, pode ser utilizado o meio agar sangue, que facilita o crescimento de microrganismos fastidiosos ou o agar MacConkey, melhor para o crescimento de bactérias entéricas e de *Pseudomonas* (McVey, 2013). Para bactérias orais, são também utilizados Caldo de Cérebro-Coração (BHI), meio de soja tripticase (TSA) e meio Tripticase-Fitona-Extrato de Levedura (TPY), sendo que em caso de anaeróbias deve ser adicionado 5% de sangue desfibrinado,

ou 5% de soro, hemoglobina clorada e vitamina K1 para permitir o seu crescimento (Peng et al., 2015).

A realização de radiografias é importante para a identificação de lesões ósseas, como osteomielite, secundárias à infecção oral (Hedley, 2016; Mehler & Bennett, 2003).

1.3.1.2. Terapêutica

Muitas vezes inicia-se um antibiótico de largo espectro antes do resultado da cultura e AST, em caso do tratamento tópico não esteja a resultar. Podem ser usados antibióticos como enrofloxacina ou ceftazidima, dependendo da via de administração e do tamanho do animal, mas um estudo mais recente aconselha, como opção inicial, o tratamento com trimetoprim-sulfonamida (Hedley et al., 2021; Mehler & Bennett, 2003; Mitchell & Diaz-Figueroa, 2005; O'Rourke & Schumacher, 2002).

Quando há lesão óssea secundária, deve iniciar-se um tratamento com o antibiótico apropriado de largo espectro, de seguida realizar cirurgia de desbridamento de tecido oral e osso infetado e a melhoria do manejo com a diminuição do stress ambiental e manutenção de boa saúde oral (Hedley, 2016; Mehler & Bennett, 2003).

Tratamento tópico, referido anteriormente, deve ser logo iniciado, e consiste na lavagem regular da lesão, irrigando o local com uma solução diluída a 0.05% de clorhexidina, e a aplicação de antibiótico como creme de sulfadiazina de prata. É importante assegurar a analgesia devido à componente dolorosa associada às estomatites (Hedley et al., 2021; Mehler & Bennett, 2003).

Em casos específicos, como em infeções orais por *Salmonella* spp. ou *Mycobacterium* spp., não foi descoberta uma antibioterapia eficaz. O mesmo ocorreu quando se tentou realizar estes tratamentos em animais colonizados por estas bactérias mas sem sinais clínicos, devido ao potencial zoonótico que estas espécies bacterianas possuem (Mehler & Bennett, 2003; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

Antibióticos frequentemente utilizados nestas infeções são também, as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos devido às culturas isoladas de gram-negativas, mas também foram utilizados, com sucesso, outros antibióticos como ceftazamida, carbenicilina e cloranfenicol. Também existe uma alta frequência de infeções por anaeróbios, logo, no tratamento, deve incluir-se antibiótico como clindamicina, metronidazol e, como as gram-negativas são frequentes, pode-se utilizar cloranfenicol, ceftazamida que são eficazes para ambas (Mehler & Bennett, 2003).

1.3.2. Patologias por mordedura

Em répteis, infecções bacterianas secundárias a mordeduras são comuns, e é possível associar as bactérias patogénicas, isoladas em lesões, às da flora oral do animal agressor (Zancolli et al., 2015). A flora oral do agressor vai ser influenciada pelo microbioma da presa e de outros alimentos. Como tal, em cobras, teoriza-se que parte do seu microbioma tem natureza fecal, porque, durante a ingestão, as presas defecam dentro da cavidade oral do predador, podendo colonizá-la (Artavia-León et al., 2017; Dipineto et al., 2014; Zancolli et al., 2015).

Há relato de uma septicémia num crocodilo provoca provavelmente por *Stenotrophomonas maltophilia* devido a uma mordedura de outro com o qual partilhava o recinto (Harris & Rogers, 2001).

Em répteis saudáveis e doentes foram isoladas bactérias do género *Serratia* spp. na sua cavidade oral. A sua patogenia ainda não é completamente conhecida, mas a sua infeção é normalmente consequência de uma mordida ou uma infeção oportunista (Mehler & Bennett, 2003).

1.3.3. Potencial patogénico e zoonótico

Os répteis podem servir de reservatório de bactérias patogénicas, para humanos e outros animais, podendo transmiti-las através de contacto, direto ou indirecto, ou por mordedura (Babalola & Balogun, 2013; Foti et al., 2013; Zancolli et al., 2015). Normalmente as bactérias comensais não são causadoras de doença em humanos saudáveis, mas podem causar doença grave em imunodeprimidos, sendo essencial manter os cuidados de higiene no manuseio dos animais (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015). Na caracterização da flora oral de cobras, Jho e colaboradores (2011) identificaram apenas uma espécie não patogénica oportunista para os humanos. Contudo, diversas bactérias da cavidade oral destes animais têm potencial zoonótico, como por exemplo *Acinobacter calcoaceticus*, *Hafnia alvei*, *Shigella* spp., *Klebsiella oxycota*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia* spp., *Campylobacter fetus*, e *Enterococcus* spp. (Babalola & Balogun, 2013; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015).

Salmonella spp., pode infetar uma pessoa por transmissão fecal-oral, por uma mordida ou arranhão, podendo esta infeção ser indireta através do contacto com objetos contaminados do terrário (Foti et al., 2013; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002). As salmonelas são maioritariamente perigosas para pessoas com imunidade reduzida, como grávidas e crianças, sendo aconselhado que estes evitem o contacto com os animais (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

De um modo semelhante, *Micrococcus luteus*, também pode infectar pessoas com menor imunidade. Esta bactéria patogénica foi isolada em crocodilos, numa população onde estavam a ocorrer mortes súbitas, comprometendo a imunidade dos animais afetados (Artavia-León et al., 2017). Em alguns répteis aquáticos, foram relatadas infeções atípicas de micobacterioses e *Edwardsiella tarda*, que também podem representar um risco acrescido para pessoas imunodeprimidas ou com doenças subjacentes (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

A bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* encontra-se no meio ambiente e foi isolada na cavidade oral de diversos répteis. É uma bactéria multirresistente e um importante agente patogénico para os humanos, comum em infeções nosocomiais, atingindo principalmente o trato respiratório (Hejnar et al., 2007).

No caso das infeções por *Mycobacterium* spp., também se deve ter em conta a sua cronicidade debilitante, o seu elevado potencial zoonótico e a dificuldade do tratamento médico, devendo, por isso, ser ponderada a eutanásia do um animal infetado (Hedley, 2016; Mehler & Bennett, 2003; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

Perante uma mordida, pode ocorrer infeção local dos tecidos. Nas cobras, é comum que a infeção seja por *Aeromonas hydrophilla* (Babalola & Balogun, 2013), mas *Serratia* spp. foi também identificado em lesões infectadas de mordeduras em humanos, por exemplo, por *S. marcescens* após a mordedura de uma cobra-liga (*Thamnophis* sp) (Cushing et al., 2011; Mehler & Bennett, 2003). Já foram também descritas infeções por *Streptococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Salmonella arizonae*, *S. liquefaciens*, *Yersinia enterocolitica* (Padhi et al., 2020).

Nas cobras não venenosas, a manifestação mais comum de mordedura é a infeção local dos tecidos, com eventual formação de abcessos, podendo evoluir para situações fatais (Dehghani et al., 2016; Ghosh et al., 2017; Lukač et al., 2017). As mordeduras de cobras venenosas podem ter efeitos hemorrágicos, neurotóxicos ou provocar necrose local dos tecidos, podendo igualmente ocorrer infeção, causada por bactérias inoculadas pela mordedura, ou secundária (Babalola & Balogun, 2013; Dehghani et al., 2016; Ghosh et al., 2017).

1.3.4. Prevenção da transmissão

Para prevenir a transmissão de microrganismos patogénicos, deve-se ter equipamentos e procedimentos específicos para a limpeza dos objetos do recinto, e lavar as

mãos minuciosamente após a manipulação dos animais (Foti et al., 2013; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

No caso de répteis aquáticos, os humanos são infetados, normalmente, quando se limpa o aquário/terrário, sendo por isso importante o cuidado quando se contacta com água contaminada, principalmente se existirem lesões nas mãos. Deve-se sempre usar luvas no manuseio dos répteis e do seu equipamento, e proceder à lavagem minuciosa das mãos após a manipulação (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002).

1.4. Flora bacteriana residente

Na cavidade oral de répteis, são regularmente identificadas bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., e *Escherichia coli*, tanto em animais saudáveis, como em situações de estomatites ou outras patologias (Cushing et al., 2011; O'Rourke & Schumacher, 2002).

Em estudos realizados em iguanas verdes (*Iguana iguana*), foi possível identificar as bactérias mais comuns da flora oral como sendo *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *serratia* spp. e *Enterobacter* spp. (Barazorda Romero et al., 2015). Em cobras, foram isoladas diversas bactérias, gram-negativas e gram-positivas, sendo as mais comuns *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. e *Providencia* spp., (Babalola & Balogun, 2013; Dehghani et al., 2016; Ghosh et al., 2017; Hedley et al., 2021; Jho et al., 2011; Zancolli et al., 2015).

Em cobras, é possível observar alterações significativas na flora oral, dependendo da espécie, da origem, se é de cativeiro ou selvagem, se está saudável, se comeu recentemente e a condição desta presa, o seu tipo de predação e o tipo de presa (Artavia-León et al., 2017; Ghosh et al., 2017). Nestes animais, há uma predominância das bactérias gram-negativas na cavidade oral, possivelmente devido aos hábitos alimentares, pois a cabeça é a primeira parte a ser ingerida, permitindo que bactérias da flora intestinal fiquem na cavidade oral no fim da ingestão (Artavia-León et al., 2017; Babalola & Balogun, 2013). Contudo, Ghosh e colaboradores (2017), relatou uma maior quantidade de bactérias gram-positivas isoladas na flora saudável, enquanto as doentes apresentavam mais gram-negativas, como *Pseudomonas* spp, *Providencia* spp.

Nas cobras venenosas, é possível isolar uma maior variedade de bactérias, por exemplo, do género *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*), *Enterococcus* (*E. faecalis* e *E. faecium*), *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. Vulgaris* e *P.*

pennerii), *Salmonella* (*S. arizone*, *S. typhimurium* e *S. paratyphi*), *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. diversus*), *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*), mas também *Lysinobacillus* spp. ou *Staphylococcus* spp. (*S. sciuri*), *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Providencia* spp., *Aeromonas hydrophila* e *Micrococcus* spp (Padhi et al., 2020).

Num estudo realizado, por Yak e colaboradores (2015), à flora oral de pitons reticuladas (*Python reticulatus*) todos os exemplares apresentaram culturas orais positivas mas 70% das culturas eram polimicrobianas, tendo sido identificadas 24 espécies de bactérias, 20 das quais patogénicas para humanos. A maioria das bactérias isoladas eram gram-negativas, tendo sido também isoladas bactérias anaeróbias, sendo *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus sciuri* as bactérias mais predominantes.

Na Croácia, foram identificadas floras orais bastante similares em cobras de quatro linhas (*Elaphe quatuorlineata*), residentes em duas ilhas diferentes, sem diferenças significativas no número e tipos de bactéria isoladas. Em ambas as ilhas, foram identificadas as seguintes bactérias: *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Lukač et al., 2017).

Bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus* spp., são também comumente isoladas em répteis, não sendo consideradas patogénicas na maioria dos casos (Ghosh et al., 2017; O'Rourke & Schumacher, 2002). Quando se isola *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa, associado a doença, considera-se que há patogenicidade destas bactérias (O'Rourke & Schumacher, 2002; Padhi et al., 2020).

A salmonelose tem um elevado potencial zoonótico, e diversos répteis, tanto selvagens como em cativeiro, estão associados a casos de salmonelose em humanos (O'Rourke & Schumacher, 2002; Schumacher, 2006).

1.4.1. *Enterobacter*

No género *Enterobacter*, estão incluídos bacilos gram-negativos que podem ser isolados no ambiente como água, solo e plantas (Davin-Regli et al., 2019). Estão também associados à microbiota intestinal de diversas espécies e podem estar presentes na flora oral de diversas espécies de répteis. São consideradas bactérias patogénicas oportunistas, e as suas infeções têm uma alta mortalidade e morbilidade, devido à sua elevada capacidade de desenvolver resistências a antibióticos e aos seus diversos fatores de virulência (Cushing et al., 2011; Martins et al., 2017; Narayanan, 2013). Devido ao seu fator oportunista afetam principalmente animais com imunidade reduzida (Martins et al., 2017).

1.4.2. *Pseudomonas*

As bactérias do género *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos também considerados patogénicos oportunistas. *P. aeruginosa*, é encontrada na microflora da cavidade oral de diversas espécies de répteis, mas também no ambiente, como solo e água (Cushing et al., 2011; Wellehan & Divers, 2019; Martins et al., 2017). Em caso de mordedura, por um animal portador desta bactéria, pode ocorrer abscesso, infeção e necrose dos tecidos no local da mordida (Foti et al., 2013; Ghosh et al., 2017).

Pseudomonas spp. têm diversos fatores de virulência, são bactérias com uma elevada capacidade de criar resistência a antibióticos e, devido a estes fatores, estão associadas a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade nos seus hóspedes, sendo principalmente preocupante para animais imunodeprimidos pois, quando são saudáveis, esta não tende a causar infeções (Foti et al., 2013; Narayanan, 2013). Podem ser as causadoras de lesões no tegumento, pneumonia, septicémia e lesões orais como estomatites ulcerativas primárias ou secundárias, que podem evoluir para osteomielite (Foti et al., 2013; Mehler & Bennett, 2003).

1.4.3. *Staphylococcus*

Staphylococcus spp. são bactérias gram-positivas, comumente presentes na pele de animais de sangue quente. Raramente são patogénicas para répteis, não sendo comum a sua presença em lesões, ao contrário do que acontece aos mamíferos, para os quais estas bactérias podem ser extremamente patogénicas e muito resilientes no ambiente, facilitando a infeção. Com a sua elevada resistência a antibióticos e patogenicidade para outros animais e humanos, é considerada preocupante em questões de saúde pública (Wellehan & Divers, 2019; Smeltzer & Beenken, 2013).

1.4.4. *Salmonella*

As salmonelas são comuns no trato intestinal de animais de sangue quente e de sangue frio, estando também presentes no solo, água, alimentos e fezes. Nos répteis, foram isoladas diversas estirpes, mas, em certos estudos, não são consideradas um problema de saúde pública, pois os répteis hospedeiros raramente excretam as bactérias através das fezes (M. Clancy et al., 2016; Moxley, 2013a; O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; O'Rourke & Schumacher, 2002; Schumacher, 2006). A excreção destes microrganismos pode ocorrer em casos de stress, como em casos de superlotação num local, durante o transporte ou em condições de mau manejo ambiental e alimentar (O'Rourke & Lertpiriyapong, 2015; Schumacher, 2006). Pode ocorrer transmissão de infeção fecal-oral, através de alimentos ou

água contaminadas, e a sua patogenicidade depende do estado de saúde do hospedeiro e da espécie/estirpe de *Salmonella* com o qual foi infectado (Moxley, 2013a).

A presença de *Salmonella* spp. na flora oral de cobras, está associada à introdução de novos exemplares nos recintos e ao alimento oferecido em cativeiro, principalmente em caso de roedores, pois as cobras iniciam a sua ingestão pela cabeça, sendo que no fim o rato liberta fezes na cavidade oral (Ghosh et al., 2017).

1.4.5. *Aeromonas*

As bactérias do género *Aeromonas* são bacilos gram-negativos que se podem encontrar não só na cavidade oral de répteis, como no seu ambiente e fontes de água. São patogénicas oportunistas e são comuns em estomatites em lagartos, aos quais podem causar doença mais severa e septicémia (Wellehan & Divers, 2019; Mehler & Bennett, 2003). A mais comum e relevante, em termos de saúde é a *A. hydrophila*, a qual é frequentemente isolada na cavidade oral de répteis, ou nas fontes de água dos recintos (Mehler & Bennett, 2003).

1.4.6. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa, usualmente considerada comensal do intestino em animais, estando também presente no seu ambiente. Pode ser altamente patogénica, podendo atuar como patogénio principal ou oportunista, ou secundária, a um fator imunossupressor, estando associada a estomatite bacteriana em répteis (D'Cruze et al., 2020; Ghosh et al., 2017; Hedley, 2016; Moxley, 2013b; Ren, et al., 2015).

É frequentemente isolada nas fontes de água de répteis em cativeiro, ou no habitat natural, existindo a dúvida de se os animais que têm este microrganismo comensal, contaminam o ambiente, infectando, depois, animais com imunossupressão ou, se estão primeiro infectados e depois contaminam o ambiente (Mehler & Bennett, 2003).

1.4.7. *Stenotrophomonas maltophilia*

A bactéria *S. maltophilia* já foi identificada na flora oral de cobras como bactéria patogénica e como residente habitual da flora. Em cerca de 10% dos répteis, tanto em liberdade, como em cativeiro, esta bactéria é isolada como parte da flora oral normal (Hejnar et al., 2007), tendo sido considerada causadora de estomatites ulcerativas em cobras e de septicémia em crocodilos (Hejnar et al., 2007; J. Wellehan & Divers, 2019)

É uma bactéria gram-negativa patogénica oportunista, que também se encontra no ambiente, e que normalmente apresenta elevada resistência a antibióticos. (Hejnar et al., 2007; Wellehan & Divers, 2019).

1.4.8. *Morganella*

No género *Morganella*, *M. morganii* é a bactéria normalmente isolada em répteis. Esta encontra-se no ambiente e no trato intestinal de humanos e animais (Wellehan & Divers, 2019; Wang et al., 2013). Esta pode ser uma espécie preocupante quando isolada, pois pode causar lesões graves intestinais em animais e tem elevada resistência a antimicrobianos (Wellehan & Divers, 2019; Shaikh et al., 2017).

1.4.9. *Enterococcus*

Enterococcus spp. são bactérias gram-positivas, comensais do trato gastrointestinal de répteis, mamíferos, aves e insetos. São encontradas numa diversidade de ambientes, tendo sido identificadas na água, solo, lixo e produtos alimentares não processados. Apesar de serem consideradas comensais, têm vindo a ser reconhecidas como agentes patogénicos oportunistas em animais e humanos. Infecções em répteis podem manifestar-se como letargia, bacteriemia, septicemia, osteomielite necrosante ou provocar mesmo a morte do animal (Rose et al., 2017).

1.5. Resistência a antimicrobianos

Nas mais diversas patologias, os répteis são muitas vezes tratados com antibióticos de largo espectro, os quais frequentemente se revelam ineficazes e acabam por contribuir para a formação de estirpes resistentes, que podem ser encontradas na flora oral dos animais (Babalola & Balogun, 2013; Cushing et al., 2011; Foti et al., 2013).

Em algumas espécies de cobras em cativeiro, foi isolada *S. maltophilia* resistente a ceftazidima e cloranfenicol, o que levanta sérias preocupações em medicina humana devido à sua elevada morbilidade e mortalidade (Cushing et al., 2011; Hejnar et al., 2007). Em *Salmonella* spp. isoladas de cobras, foram também identificadas resistências à estreptomicina e ampicilina (Cushing et al., 2011).

Em tartarugas-marinhas-comuns, foram isoladas bactérias gram-negativas, que apresentaram resistência total a carbenicilina, enquanto que em ofídios, sáurios e testudines foram isoladas *A. hydrophilia* e *P. aeruginosa*, ambas multirresistentes a diversos antimicrobianos (Cushing et al., 2011).

Deste modo, de forma a evitar o desenvolvimento de estirpes multirresistentes, é muito importante basear o tratamento antimicrobiano no resultado de culturas bacterianas e AST, quer em patologias dos próprios répteis, quer em humanos, em situações de mordeduras (Padhi et al., 2020).

1.6. A Importância da caracterização da flora residente

A procura de répteis como animal de estimação é cada vez maior e, dentro destes, a piton real (*P. regius*) é uma das escolhas mais comuns, devido ao seu tamanho pequeno, fácil temperamento, resistência e grande variedade de cores (Tillis et al., 2021). Com o aumento da procura, começou a haver maior preocupação, quer por questões de saúde pública, devido ao potencial zoonótico de doenças transmitidas por estes animais, quer por questões da saúde dos próprios animais (Cushing et al., 2011; Dipineto et al., 2014).

Em répteis, como noutros animais, há uma flora oral residente, usualmente constituída por uma mistura de espécies bacterianas. Em cobras, por exemplo, foram identificadas centenas de espécies bacterianas na flora oral, sendo possível concluir que existem umas mais comumente encontradas (Babalola & Balogun, 2013). Observou-se, também, que a população bacteriana difere dependendo da espécie do animal, da localização geográfica deste e da sazonalidade. Também foi possível identificar que, em cobras venenosas, a carga bacteriana oral é superior, comparativamente às não venenosas (Artavia-León et al., 2017; Cushing et al., 2011; Dipineto et al., 2014; Padhi et al., 2020).

Logo, a determinação da flora oral residente nos répteis é importante, pois devido à falta de informação quanto à sua flora residente, as bactérias isoladas em cultura e tratadas após realizado AST, podem ser comensais ou patogénicas, e realizar-se uma antibioterapia inadequada. Foram isoladas bactérias da cavidade oral, tanto em animais doentes, como em saudáveis, para ser possível identificar a flora comensal da patogénica em cultura (Chinnadurai & DeVoe, 2009; Mitchell & Diaz-Figueroa, 2005).

Outro fator que torna muito importante o conhecimento das bactérias comensais da cavidade oral é em caso de mordedura num humano, pois permite saber qual o melhor tratamento para a infeção secundária à mordedura. Nos países em desenvolvimento as mordeduras são comuns, principalmente em trabalhadores de campo e quem vive nas zonas rurais, chegando por vezes a ocorrer o óbito da vítima, sendo os seus níveis de morbilidade e mortalidade altos. Enquanto nos países desenvolvidos, as cobras são mantidas como animais de estimação, logo, quando ocorre mordedura, é usualmente devido a mau manuseamento ou a ataque, sendo menos frequente a morte (Babalola & Balogun, 2013; Dehghani et al., 2016; Ghosh et al., 2017).

1.7. Objetivos

Este estudo teve como objetivo a identificação da flora oral aeróbia de *Python regius* saudáveis, contribuindo assim para a caracterização das bactérias comensais e para o estabelecimento de uma referência para a flora oral saudável nesta espécie.

2. Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comité de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias com o processo n.º 116-2022.

2.1. Amostra do estudo

Foram incluídos no estudo todos os animais saudáveis pertencentes a um criador certificado. Todos os animais nasceram e foram criados em cativeiro, sendo mantidos em sistema de gavetas. Um total de 20 pitons reais (*Python regius*) foram usadas, 12 fêmeas (F) e 8 machos (M), com idades compreendidas entre os 3 e os 13 anos, com uma média de 7 anos, e pesos compreendidos entre os 0,759 kg e os 2,434 kg, com uma média de 1,522 kg.

2.2. Colheita das zaragatoas orais

Para a recolha das amostras, foram tidos em conta os cuidados de higiene necessários para o maneo dos animais e colheita assética, tendo-se usado luvas para a recolha e desinfetado as mãos com solução antissética, de base alcoólica, antes de manusear cada exemplar. Todos os animais foram pesados antes da recolha (figura 12) e os dados relativos ao sexo e idade registados.

A cada piton foram realizadas duas zaragatoas da cavidade oral (figura 13), uma preservada em meio AMIES (Deltalab, Ref 300287) e outra em 1mL de meio AMIES líquido (Copan, Ref 490CE.A).



Figura 12. Pesagem dos exemplares.



Figura 13. Recolha das amostras.

2.3. Análise laboratorial

No laboratório, adicionaram-se 100 μ L de meio líquido em Caldo Coração-Cérebro com Tiamina (BHI-T) (Biomérieux, Ref 42081) a cada zaragatoa, e foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Foram retirados 10 μ L de cada amostra e semeados, numa diluição de 1:100 em solução salina, nos seguintes meios de cultura: Columbia ANC Agar + 5% sheep blood (CNA) (Biomérieux; Ref 43071); MacConkey Agar (MCK) (Biomérieux, Ref 43141); chromID Salmonella/Hektoen Agar (Biomérieux, Ref 43465); chromID CPS Elite (CPSE) (Biomérieux, Ref 418284); Chocolate agar + PolyViteX (PVX) (Ref 43101). As placas foram incubadas a 37°C e avaliou-se o crescimento de microrganismos às 24, 48 e 72 horas.

Após a coloração Gram (Liofilchem®, Ref 80293), a identificação dos microrganismos foi realizada com o equipamento VITEK-2 compact (Biomérieux), com recurso às cartas de identificação VITEK 2 GP (Biomérieux, Ref 21342) e VITEK 2 GN (Biomérieux, Ref 21341). Foram ainda utilizados métodos complementares, como crescimento em meio enriquecimento Selenite F broth (SELENITE F-T) (Biomérieux, Ref 42099) e teste de catálase.

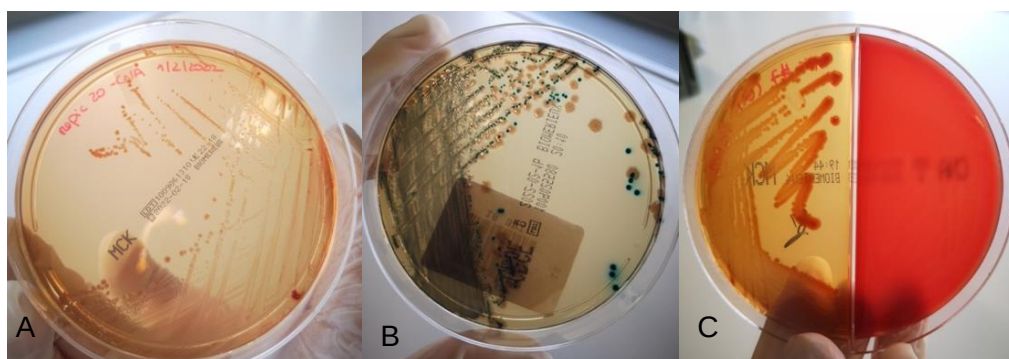


Figura 14. Diferentes resultados de cultura: A) *Acinetobacter*; B) *Pseudomonas* e *Enterobacter*; C) *Aeromonas*.

3. Resultados

A amostra em estudo consistiu em 20 exemplares de pitons reais, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 3 e os 13 anos e com pesos entre as 0,759 kg e os 2,434 kg (tabela 1).

Um total de 57 colónias bacterianas foram isoladas das zaragatoas efectuadas. Destas, foram isoladas 13 espécies de bactérias e identificadas 12, pertencentes a 10 géneros, com variações entre exemplares nas espécies e no número de espécies isoladas (tabela 1). A maior diversidade de espécies bacterianas encontrada foi de cinco e a menor de dois. Foram isoladas sete bactérias Gram-negativas, nomeadamente *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter*, *Enterobacter complex*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e seis bactérias Gram-positivas, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri* e *Micrococcus luteus*. Uma das bactérias Gram-positivas isolada não foi possível identificar e foi intitulada de gram + não identificada (figura 15 e 16). As bactérias mais isoladas foram *Enterococcus faecium* e *Aeromonas hydrophila* tendo sido identificadas, respetivamente, em 100% e 70% dos exemplares (tabela 2).

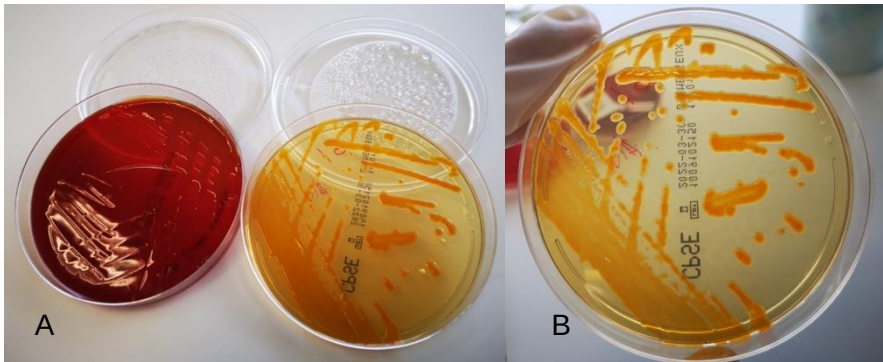


Figura 15. A) e B) Cultura da bactéria gram + não identificada.

Detalhes Bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	+	14	CDEX	-	15	AspA	+	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	-	46	BACI	-
47	NOVO	-	50	NC6.5	-	52	dMAN	-	53	dMNE	-	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	-	59	SAL	-	60	SAC	-	62	dTRE	-	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Figura 16. Detalhes bioquímicos da bactéria gram + não identificada (Anexo 1).

Tabela 1. Dados obtidos de cada exemplar (Feminino (F) , Masculino (M)).

Exemplar	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Nº de microrganismos	Espécie
1	F	13	1,772	5	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
2	M	6	1,622	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
3	M	6	1,076	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
4	F	4	0,897	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Salmonella</i> spp.
5	M	8	1,555	4	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Morganella morganii</i>
6	F	7	1,647	3	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
7	M	3	1,091	3	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Enterobacter complex</i>
8	F	6	2,118	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
9	F	6	1,627	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
10	M	4	1,053	5	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Acinetobacter</i> Gram + não identificada

Tabela 1. Continuação (Feminino (F), Masculino (M)).

Exemplar	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Nº de microrganismos	Microrganismos
11	M	8	1,648	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
12	M	3	1,266	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	F	7	1,236	3	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
14	F	8	1,848	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterobacter complex</i>
15	F	12	2,434	3	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
16	F	3	1,544	4	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
17	F	9	2,108	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>
18	M	4	0,759	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
19	F	10	2,065	2	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterobacter complex</i>
20	F	13	1,072	5	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Acinetobacter</i> Gram + não-identificada

Tabela 2. Frequência das espécies isoladas no estudo.

Bactéria isolada	Nº de exemplares	%
<i>Enterococcus faecium</i>	20	100
<i>Aeromonas hydrophila</i>	14	70
<i>Staphylococcus sciuri</i>	6	30
<i>Enterobacter</i> spp	3	15
<i>Staphylococcus xylosus</i>	3	15
<i>Acinetobacter</i> spp	2	10
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	10
Gram + não identificada	2	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	5
<i>Micrococcus luteus</i>	1	5
<i>Morganella morganii</i>	1	5
<i>Salmonella</i> spp.	1	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	5

4. Discussão

Este estudo identificou a flora oral aeróbia cultivável de 20 pitons reais criadas e mantidas em cativeiro, contribuindo para a criação de uma referência da flora oral normal nesta espécie.

Todos os exemplares incluídos no estudo apresentaram uma flora polimicrobiana, com diferentes diversidades. A maioria das pitons apresentou culturas com 2 a 3 microrganismos, havendo 3 exemplares (identificados como 1, 10 e 20), com 5 microrganismos isolados, e 2 exemplares (identificados como 5 e 16), com 4 microrganismos isolados

Foram isoladas 13 espécies de bactérias, seis Gram-positivas e sete Gram-negativas, tendo-se verificado proporção Gram-positivas/Gram-negativas equilibrada. Dipineto e colaboradores (2014), observou em pitons reais uma maior percentagem de gram-negativas, como *Pseudomonas* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, com uma relação de 80% destas para 20% de Gram-positivas, como *Staphylococcus* spp. e *Clostridium* spp. No estudo realizado por Artavia-León e colaboradores (2017) em diferentes cobras, identificou-se também *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*. Algumas destas espécies também se encontravam presentes em pitons reais em cativeiro na Nigéria, onde se identificaram as gram-negativas *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *Pseudomonas proteolytica* e *Yersinia enterocolitica*. Enquanto as gram-positivas encontradas foram *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus mycoides* e *B. pumilus* (Babalola & Balogun, 2013).

Enterococcus spp. são bactérias comuns na cavidade oral de diversos répteis. Num estudo com diversas espécies de cobras foram isoladas bactérias do género *Enterococcus* em 6,2% da amostra (Dehghani et al., 2016), enquanto noutra (em *Echis carinatus*) foram isoladas em 10% (Padhi et al., 2020). Espécies deste género não foram reportadas em nenhum outro estudo realizado à cavidade oral de pitons reais. Neste estudo, contudo, *E. faecium* isolou-se em 100% (n=20) dos indivíduos. Em tartarugas marinhas verdes, (*Chelonia mydas*), *E. faecium* estava presente em 55% dos animais saudáveis, sendo a bactéria mais isolada nestes animais, concluindo que esta bactéria pertencia à flora oral normal destes animais (Vega-Manriquez et al. 2018).

E. gallinarum não se apresenta regularmente em isolados de culturas orais de répteis, tendo sido aqui identificada em apenas 10% (n=2) dos animais. Em dois estudos, um de Plenz e colaboradores (2015), realizado em cobras de diversas espécies, e outro de Vega-Manriquez e colaboradores (2018), em tartarugas marinhas verdes (*Chelonia mydas*), foi possível isolar esta bactéria em, respetivamente 2% e 5% dos exemplares.

No estudo de Dipineto e colaboradores (2014), diversas espécies de *Staphylococcus* foram isoladas, sendo a maioria *S. aureus* (em 51 de 60 exemplares) e depois *S. intermedius* (nos restantes 9 exemplares). Num estudo realizado em pitons reais, num rancho de cobras

no Togo, foi um dos géneros mais isolados (D'Cruze et al., 2020), tendo também sido descritas na cavidade oral de outras espécies de cobras no estudo de Jho e colaboradores (2011) com uma prevalência de 33%. Em tartarugas-de-patas-vermelhas (*Chelonoidis carbonaria*), bactérias do género *Staphylococcus* foram isoladas em 72,7% dos exemplares, com maior expressividade de *S. sciuri* que foi identificada em 81,3% nos exemplares com estas bactérias. As restantes bactérias isoladas foram *S. xylosus* (12,5%), *S. kloosi* (4,2%) e *S. saprophyticus* (2%) (Santana et al., 2022). Já em pitons reticuladas (*P. reticulatus*), *S. sciuri* identificou-se em 40% dos exemplares, sendo a segunda bactéria mais abundante no estudo (Yak et al., 2015). No presente estudo, *S. sciuri* estava presente em 30% (n=6) dos animais, e a autora não tem conhecimento da identificação desta espécie em piton real, enquanto *S. xylosus* foi identificada em 15 % (n=3), sendo esta a primeira descrição destas bactérias na flora oral de pitons reais. Foi, contudo, já descrita por Jho e colaboradores (2011) em pitons birmanesas (*Python molurus bivittatus*), e por Santana e colaboradores (2022) em tartarugas-de-patas-vermelhas (*C. carbonaria*).

A única bactéria Gram-positiva presente em apenas um exemplar foi *Micrococcus luteus*. Esta bactéria patogénica oportunista, não tendo sido isolada em nenhum estudo realizado à cavidade oral de pitons reais, foi identificada em estudos realizados em outras espécies de cobras, a tartarugas marinhas verdes (*Chelonia mydas*) e a dragões barbudos (*Pogona vitticeps*) (Lukač et al., 2017; Mataranyika & Chimwamurombe, 2019; Plenz et al., 2015; Vega-Manriquez et al., 2018). Esta também pode ser isolada no solo, água e pele de humanos (Danilova et al., 2020).

A segunda bactéria mais comumente identificada foi *Aeromonas hydrophila*, apresentando-se em 70% dos exemplares neste estudo, ao contrário da descrição de Dipineto e colaboradores (2014) na qual apenas 30% dos 60 exemplares de pitons reais tinham esta bactéria na sua cavidade oral.

Bactérias pertencentes ao género *Enterobacter*, foram isoladas em 15% dos exemplares deste estudo. Dipineto e colaboradores (2014), isolou *E. cloacae* na cavidade oral de 12 dos 60 exemplares de pitons reais utilizados, tendo esta espécie sido isolada também em *Testudines*, como *Podocnemis unifilis* (Benevides de Moraes et al., 2011). Outras bactérias do género *Enterobacter* foram isoladas noutros estudos, como *E. aerogenes* em pitons birmanesas e víboras (*Echis carinatus*) (Jho et al., 2011; Padhi et al., 2020).

Bactérias do género *Acinetobacter*, foram identificadas em 2 exemplares (10%), não tendo, contudo, sido possível identificar a espécie, devido às limitações dos testes bioquímicos utilizados. As bactérias deste género são patogénicas oportunistas e normalmente apresentam uma elevada resistência a antibióticos (Wellehan & Divers, 2019). Podem ser encontradas em diversos locais como no solo, água, comida ou nos animais,

conseguindo sobreviver em ambientes secos e rigorosos e num grande intervalo de temperaturas (Doughari et al., 2011). Bactérias deste género foram descritas em pitons reais (D'Cruze et al., 2020) e em 28% de pitons birmanesas (Jho et al., 2011) e pitons reticuladas (Yak et al., 2015). Dipineto e colaboradores (2014) isolou *A. calcoaceticus* em 40% dos exemplares de pitons reais e Benevides de Moraes e colaboradores (2011) em *Podocnemis unifilis*.

As restantes bactérias gram-negativas, *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram isoladas em apenas 5% (n=1) dos animais. Neste estudo não foi possível identificar a espécie de *Salmonella* isolada.

No estudo de Dipineto e colaboradores (2014) isolou-se *Salmonella* spp em 15% das pitons reais usadas, tendo sido especificamente identificadas as bactérias seguintes: *S. blukwa*, *S. diarizonae*, *S. enteritidis* e *S. oranienburg*. Por sua vez, Dehghani e colaboradores (2016), encontrou *Salmonella* spp em 18.8% da população mista de cobras venenosas e não venenosas estudada, e Padhi e colaboradores (2020) em 12% dos exemplares de *Echis carinatus* avaliados. Estes estudos apresentam percentagens de isolamento de *Salmonella* semelhantes, tendo, contudo Yak e colaboradores (2015) identificado *S. enterica diarizonae* em apenas um animal (4%), de um modo semelhante a este estudo.

Morganella morganii foi uma bactéria referenciada como colonizadora habitual da flora oral de cobras por Pereira e colaboradores (2017), tendo sido uma das bactérias predominantes na população estudada (*Bothrops atrox*). Em pitons birmanesas, esta bactéria foi isolada em apenas 2 exemplares (11%) (Jho et al. 2011), tendo sido identificada em pitons reais por Babalola & Balogun (2013) e Dipineto e colaboradores (2014), que identificou *M. morganii* em 75% da população, sendo a bactéria gram-negativa mais frequente do estudo.

Klebsiella pneumoniae é comensal do trato intestinal dos animais, mas também se encontra no ambiente, no solo, na água e vegetação. É uma bactéria patogénica oportunista e uma das mais comuns causadoras de doença em Medicina Veterinária (Bagley, 1985; Moxley, 2013a). No estudo de Jho e colaboradores (2011), isolou-se na cavidade oral de um exemplar de piton birmanesa, tendo sido isolada noutro exemplar *K. oxytoca*. Na Índia, a *K. pneumoniae* foi isolada na cavidade oral de duas cobra-capelo (*Naja naja*) e numa víbora-de-russell (*Daboia russelii*) (Shaikh et al., 2017). Num estudo, realizado em pitons reticuladas, esta bactéria foi isolada num só exemplar (4%) (Yak et al., 2015), tendo em tartarugas verdes sido isolada em 2 animais, mas ambos com sintomas de estomatite (Vega-Manriquez et al., 2018). Podemos assim afirmar que esta bactéria não parece ter uma presença comum na flora oral dos répteis saudáveis.

Em pitons reais, identificou-se *Pseudomonas* spp. em 85% dos animais, tendo sido identificada *P. aeruginosa* em 42 animais e *P. putida* em 9 animais (Dipineto et al., 2014).

Outro estudo identificou apenas *P. proteolytica* (Babalola & Balogun, 2013). No estudo de Jho e companhia (2011), *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado na cavidade oral (33% das amostras), com a identificação de *P. aeruginosa* e *P. putida*. Também Yak e colaboradores (2015) identificou majoritariamente *Pseudomonas*, com isolamentos em 50% dos exemplares, 20% com *Pseudomonas* spp, 20% com *P. aeruginosa* e 10% com *P. stamineae*. Outros trabalhos identificaram *Pseudomonas* com menor frequência, como o de Padhi e colaboradores (2020) em apenas 16% da população, incluindo as espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. stutzeri*, ou o de Shaikh e colaboradores (2017), onde *P. aeruginosa* foi isolado em 9,34% da população estudada. O presente estudo identificou *P. aeruginosa* em 5% (n=1) da população apenas, em oposição ao observado por Dipineto e colaboradores (2014), por exemplo, o que nos permite concluir que a presença deste microrganismo na população de pitons reais não é constante, sendo considerado comum o seu isolamento em animais saudáveis.

A identificação dos microrganismos neste estudo foi realizada com o sistema automatizado Vitek Compact da Biomerieux, o qual faz o cruzamento dos resultados obtidos nos testes bioquímicos com uma base de dados conhecida. No caso da bactéria Gram-positiva não identificada, não houve compatibilidade dos testes bioquímicos com a base de dados existente, o que pode ter ocorrido devido a esta bactéria não constar na base de dados ou por ser uma subespécie que apresente variações em um ou mais destes testes, impossibilitando a sua identificação.

Os microrganismos presentes na flora oral destes animais são normalmente encontrados no ambiente, como no solo e água, e no trato intestinal de diversos animais. Muitos estão presentes nos tratos intestinais das presas, as quais defecam aquando da ingestão, podendo ser potenciais colonizadores da flora oral dos predadores. Contudo, neste estudo os exemplares são alimentados com ratos congelados, sendo difícil a colonização destas bactérias através das fezes do rato ingerido (Ghosh et al., 2017). Por outro lado, os tratos gastrointestinais dos próprios répteis estão também colonizados por algumas destas bactérias (e.g. *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *P. aeruginosa* e *M. morganii*) podendo os próprios contaminar as suas fontes de água, contribuindo para a colonização da flora oral por estas bactérias. Ferreira e colaboradores (2010) comparou a diferença das floras orais de cascavéis-de-quatro-ventas (*Crotalus durissus terrificus*) selvagens, com as mantidas em cativeiro coletivo (em recintos exteriores), e as mantidas em cativeiro isolado (em caixas individuais), tendo concluído que os animais selvagens apresentam uma flora oral mais equilibrada que os mantidos em cativeiro, e, dentro destes últimos, os animais em cativeiro coletivo, com acesso a ventilação e exposição solar, apresentavam melhor saúde oral que os em cativeiro isolado. O recinto exterior, devido à maior área, diminui a probabilidade de

contaminação das águas e, consequentemente, a diversidade microbiana da flora destes animais comparativamente aos mantidos em caixas. No presente estudo os animais são mantidos em sistema de gavetas, ou seja, são mantidos individualmente em espaços limitados, o que pode justificar o isolamento de algumas destas bactérias na flora oral por auto-contaminação.

O único género bacteriano não patogénico para répteis isolado neste estudo foi *Staphylococcus*, sendo todos os restantes considerados patogénicos oportunistas para estes animais, o que indica que caso haja uma diminuição da competência imunitária destes, qualquer uma destas bactérias pode vir a causar doença ao animal.

No exemplar número 18 isolou-se *P. aeruginosa*, tendo o tutor depois reportado que a condição corporal deste estava ligeiramente diminuída. Este animal iniciou antibioterapia com Marbofloxacin, uma fluoroquinolona de terceira geração, aconselhada após realização de AST, estando referenciado o seu uso em pitons reais (Wellehan & Divers, 2019). *P. aeruginosa* está presente na cavidade oral de diversas espécies de répteis saudáveis e no ambiente (Wellehan & Divers, 2019), sendo que está normalmente presente em infeções secundárias em répteis devido a um comprometimento imunitário destes (Mcvey, 2013). No caso do exemplar 18 a presença desta bactéria associada a perda de peso pode dever-se a uma infeção causada por esta, mas secundária a um fator que tenha imunocomprometido o animal.

5. Conclusão

Numa população de 20 pitons reais, nascidas e criadas em cativeiro e pertencentes ao mesmo tutor, realizou-se cultura da flora oral aeróbia de cada indivíduo. Foi possível isolar seis bactérias gram-positivas, *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum*, *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri*, *Micrococcus luteus* e uma não identificável, e sete espécies gram-negativas, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., *Morganella morganii*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*,

Este estudo registou a flora oral aeróbia de um grupo de pitons reais, mantidas em cativeiro em Portugal, o que, junto com o conhecimento de outros estudos idênticos, contribui para uma correcta tipificação da flora oral microbiana desta espécie exótica, cada vez mais popular. Esta informação é de extrema importância para o médico veterinário na prática clínica e para os tutores dos animais e sublinha a importância dos cuidados de higiene no alojamento destes animais e na prevenção da transmissão de agentes patogénicos ao Homem.

Contudo, mais informação deve ser recolhida, por exemplo, com a realização de cultura de bactérias anaeróbias e cultura de fungos da cavidade oral de pitons reais saudáveis, e com a ampliação da amostra, abrangendo diversos criadores e tutores, e animais em diferentes tipos de recinto, como o sistema de gavetas, terrário ou acesso ao exterior. Por outro lado, a comparação da flora da cloaca, da flora retal do alimento (e.g. ratos) e da flora dos diferentes tipos de alimento (e.g alimento vivo vs morto) pode permitir perceber diferenças no perfil encontrado em diferentes indivíduos/situações, contribuindo assim para uma melhor referenciação da flora oral normal nesta espécie.

Bibliografia

- Alexander, S. (2019). Tuatara Taxonomy, Anatomy, and Physiology. In: S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicina and Surgery* (3^aEd., pp. 83-85). Saint Louis: Elsevier.
- Artavia-León, A., Romero-Guerrero, A., Sancho-Blanco, C., Rojas, N., & Umaña-Castro, R. (2017). Diversity of Aerobic Bacteria Isolated from Oral and Cloacal Cavities from Free-Living Snakes Species in Costa Rica Rainforest. *Intenational Scholarly Research Notices*, 2017: 1–9.
- 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): 348–355.
- Bagley, S. T. (1985). Habitat Association of Klebsiella Species. *Infection Control*, 6(2): 52-58.
- Barazorda Romero, S., Čížek, A., Masaříková, M., & Knotek, Z. (2015). Choanal and cloacal aerobic bacterial flora in captive green iguanas: A comparative analysis. *Acta Veterinaria Brno*, 84(1): 19–24.
- Barten S. & Simpson, S. (2019). Lizard Taxonomy, Anatomy, and Physiology. In: S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicina and Surgery* (3^aEd., pp. 63-74). Saint Louis: Elsevier.
- Benevides de Morais, P., Rodrigues de Souza, D., Pinheiro de Sousa, F. M., Wessel de Oliveira, K., & Sanzio Pimenta, R. (2011). Enterobacteriaceae in Mouth and Cloaca Of *Podocnemis expansa* And *P. unifilis* (Testudines: Chelonia) populations of National Park of Araguaia Plains, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 526–530.
- Boyer, T. H. & Innis, C. J. (2019). Chelonian Taxonomy, Anatomy, and Physiology. S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicina and Surgery* (3^aEd., pp. 31-49). Saint Louis: Elsevier.
- Chinnadurai, S. K., & DeVoe, R. S. (2009). Selected Infectious Diseases of Reptiles. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 12(3): 583–596.
- Cushing, A., Pinborough, M., & Stanford, M. (2011). Review of bacterial and fungal culture and sensitivity results from reptilian samples submitted to a UK laboratory. *Veterinary Record*, 169(15): 390.
- Danilova, N. D., Solovyeva, T. V., Mart'yanov, S. V., Zhurina, M. V., & Gannesen, A. V. (2020). Stimulatory Effect of Epinephrine on Biofilms of *Micrococcus luteus* C01. *Microbiology (Russian Federation)*, 89(4): 493–497.

Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4): 1-32.

D'Cruze, N., Bates, J., Assou, D., Ronfot, D., Coulthard, E., Segniagbeto, G. H., Auliya, M., Megson, D., & Rowntree, J. (2020). A preliminary assessment of bacteria in "ranch" ball pythons (*Python regius*), Togo, West Africa. *Nature Conservation*, 39: 73–86.

De Voe, R. (2019). Stomatitis. S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd Ed., pp. 1345-1346). Saint Louis: Elsevier.

Dehghani, R., Sharif, M. R., Moniri, R., Sharif, A., & Kashani, H. H. (2015). The identification of bacterial flora in oral cavity of snakes. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2): 279–283.

Dipineto, L., Russo, T. P., Calabria, M., de Rosa, L., Capasso, M., Menna, L. F., Borrelli, L., & Fioretti, A. (2014). Oral flora of *Python regius* kept as pets. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5): 462–465.

Doneley B. (2018). Taxonomy and Introduction to Common Species. B. Doneley, R. Johnson, D. Monks, & B. Carmel (Eds.), *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (pp. 1-2). Oxford: Wiley Blackwell.

Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes and Environments*, 26(2) : 101–112.

Durso, A. M. & Maerz, J. C. (2019). Natural Behavior. In: S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd Ed., pp. 90-99). Saint Louis: Elsevier.

Evans, S. E. (2008). The Skull of Lizards and Tuatara. C. Gans, A. S. Gaunt & K. Adler (Eds), *Biology of the reptilia* (pp. 64-67). New York: Society of the Study of Amphibians and Reptiles.

Ferreira Junior, Siqueira, A. K., R. S., Campagner, M. V., Salerno, T., Soares, T. C. S., Lucheis, S. B., Paes A. C., et al. (2010). Comparison of Wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesq. Vet. Bras.* 29(12): 999-1003.

Foti, M., Giacobello, C., Fisichella, V., & Latella, G. (2013). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Captive Reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 22(3): 270–274.

Funk, R.S. & Bogan Junior, J. E. (2019). Snake Taxonomy, Anatomy, and Physiology. S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd Ed., pp. 50-62). Saint Louis: Elsevier.

- Ghosh, T., Biswas, M. K., Roy, P., & Guin, C. (2017). Short review of different microflora from the oral cavity of snakes. *Uttar Pradesh Journal Of Zoology*, 37(2): 30-34.
- Green, J., Coulthard, E., Megson, D., Norrey, J., Norrey, L., Rowntree, J. K., et al. (2020). Blind trading: A literature review of research addressing the welfare of ball pythons in the exotic pet trade. *Animals*, 10(193): 1-15.
- Harris, N. B. & Rogers, D. G. (2001). Septicemia associates with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* Subsp. *Tetraspis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(3): 255-258.
- Hay, J. M., Sarre, S. D., Lambert, D. M., Allendorf, F. W., & Daugherty, C. H. (2010). Genetic diversity and taxonomy: a reassessment of species designation in tuatara (*Sphenodon*: Reptilia). *Conserv Genet*, 11(3): 1063–1081.
- Hedley, J. (2016). Anatomy and Disorders of the Oral Cavity of Reptiles and Amphibians. *Vet Clin Exot Anim*, 19(3): 689-706.
- Hedley, J., & Eatwell, K. (2013). The effects of UV light on calcium metabolism in ball pythons (*Python regius*). *Veterinary Record*: 173(14), 345-350.
- Hedley, J., Whitehead, M. L., Munns, C., Pellett, S., Abou-Zahr, T., Calvo Carrasco, D., et al. (2021). Antibiotic stewardship for reptiles. *Journal of Small Animal Practice*, 62(10): 829–839.
- Hejnar, P., Bardoň, J., Sauer, P., & Kolář, M. (2007). *Stenotrophomonas maltophilia* as a part of normal oral bacterial flora in captive snakes and its susceptibility to antibiotics. *Veterinary Microbiology*, 121(3–4): 357–362.
- Hollandt, T., Baur, M., & Wöhr, A. C. (2021). Animal-appropriate housing of ball pythons (*Python regius*)—Behavior-based evaluation of two types of housing systems. *PLoS ONE*, 16(5): 1-20.
- 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. *Lab Anim Res*, 27(3): 213-217.
- Kirchgessner, M. & Mitchell, M. A. (2009). Chelonians. In: M. A. Mitchell & T. N. Tully, Jr (Eds.), *Manual of Exotic Pet Practice* (pp. 207-249). Saint Louis: Elsevier.
- Lukač, M., Tomić, D. H., Mandac, Z., Mihoković, S. & Prukner-Radovčić, E. (2017). Oral and cloacal aerobic bacterial and fungal flora of free-living four-lined snakes (*Elaphe quatuorlineata*) from Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 87(3): 351–361.
- Martins, N. B., Ferreira, L. A. R., Santos, A. L. Q., Rocha De Souza, R., Oliveira, W. J., Almeida Moreira, T., et al. (2017). Dermatopathy Caused by *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in *Boa constrictor amarali*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45(230): 1-4.

- Mataranyika, P. N., & Chimwamurombe, P. M. (2019). First Report of *Micrococcus luteus* in the Buccal Cavity of Bearded Dragon (*Pogona vitticeps*) in Namibia. *J Pure Appl Microbiol*, 13(4), 2123–2127.
- McVey, D. S. (2013). Laboratory Diagnosis. In: D. S. McVey, M. Kennedy & M. M. Chemgappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3rdEd., pp. 18-25). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Mehler, S. J., & Bennett, R. A. (2003). Oral, dental, and beak disorders of reptiles. *Vet Clin Exot Anim*, 6(3): 477–503.
- Mitchell, M. A. & Diaz-Figueroa, O. (2005). Clinical reptile gastroenterology. *Vet Clin Exot Anim*, 8(2): 277–298.
- Mitchel, M. A. (2009). Snakes. In: M. A. Mitchell & T. N. Tully, Jr (Eds.), *Manual of Exotic Pet Practice* (pp. 136-163). Saint Louis: Elsevier.
- Moxley, R. (2013a). Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In: D. S. McVey, M. Kennedy & M. M. Chemgappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3rdEd., pp. 62-74). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Moxley, R. (2013b). Enterobacteriaceae: *Salmonella*. In: D. S. McVey, M. Kennedy & M. M. Chemgappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3rdEd., pp. 75-84). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Narayanan, S. (2013). *Pseudomonas*. In: D. S. McVey, M. Kennedy & M. M. Chemgappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3rdEd., pp. 148-150). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Nevarez, J. G. (2019). Crocodilian Taxonomy, Anatomy, and Physiology. In: S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicina and Surgery* (3rdEd., pp. 75-82). Saint Louis: Elsevier.
- 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.
- O'Rourke, D. P. & Schumacher, J. (2002). Biology and Diseases of Reptiles. In: J. G. Fox, L. C. Anderson, F. M. Loew & F. W. Quimby (Eds), *Laboratory Animal Medicine* (2ndEd., pp. 827-857). American College of Laboratory Animal Medicine.
- Padhi, L., Panda, S. K., Mohapatra, P. P., & Sahoo, G. (2020). Antibiotic susceptibility of cultivable aerobic microbiota from the oral cavity of *Echis carinatus* from Odisha (India). *Microbial Pathogenesis*, 143: 1-6.
- Peng, X., Ren, B., Li, Y., Zhou, X., Xie, J., Zhou, C., et al. (2015). Techiques for Oral Microbiology. In: X. Zhou & Y. Li (Eds.), *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 15-40). Oxford: Elsevier.
- Pereira, H. C., Gomes, D. O., Hirano, L. Q. L., Santos, A. L. Q., & Lima, A. M. C. (2017). Aerobic bacteria in oral cavity of lancehead snakes (*Bothrops atrox*) with stomatitis. *Acta Scientiarum*, 39(3): 331–334.

- Pincheira-Donoso, D., Bauer, A. M., Meiri, S., & Uetz, P. (2013). Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. *PLoS ONE*, 8(3):1-10.
- Plenz, B., Schmidt, V., Grosse-Herrenthey, A., Krüger, M., & Pees, M. (2015). Characterisation of the aerobic bacterial flora of boid snakes: Application of MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Record*, 176(11): 285.
- Ren, B., Cheng, L., Peng, X., Li, Y., Li, Y., Zhou, Y., et al. (2015). Oral Mucosal Microbes. In: X. Zhou & Y. Li (Eds.), *Atlas of Oral Microbiology* (pp. 95-107). Oxford: Elsevier.
- Rose, K., Agius, J., Hall, J., Thompson, P., Eden, J. S., Srivastava, M., et al. (2017). Emergent multisystemic *Enterococcus* infection threatens endangered Christmas Island reptile populations. *PLoS ONE*, 12(7): 1-21.
- Santana, J. A., Silva, B. A., Trevizani, N. A. B., Souza, A. M. A. e, Lima, G. M. N., Furtado, N. R. M., et al. (2022). Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, 52(7): 1-8.
- Schumacher, J. (2006). Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15(1): 18–24.
- Shaikh, I. K., Dixit, P. P., Pawade, B. S., Potnis-Lele, M., & Kurhe, B. P. (2017). Assessment of Cultivable Oral Bacterial Flora from Important Venomous Snakes of India and Their Antibiotic Susceptibilities. *Curr Microbiol*, 74(11): 1278–1286.
- Smeltzer, M. S. & Beenken, K. E. (2013). *Staphylococcus*. In: D. S. McVey, M. Kennedy & M. M. Chemgappa (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3^aEd., pp. 184-193). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Tillis, S. B., Iredale, M. E., Childress, A. L., Graham, E. A., Wellehan, J. F. X., Isaza, R., et al. (2021). Oral, Cloacal, and Hemipenial Actinomycosis in Captive Ball Pythons (*Python regius*). *Front Vet Sci*, 7: 1-11.
- Toudonou, C. A. S. (2015). Ball python *Python regius*. Apresentado na vigésima oitava reunião do Animals Committee.
- Vega-Manriquez, D. X., Dávila-Arellano, R. P., Eslava-Campos, C. A., Jiménez, E. S., Negrete-Philippe, A. C., Raigoza-Figueras, R., et al. (2018). Identification of bacteria present in ulcerative stomatitis lesions of captive sea turtles *Chelonia mydas*. *Vet Res Commun*, 42(3): 251–254.
- Wang, L., Wei, Y., & Huang, Y. (2013). *Morganella morganii* as a causative agent of disease in the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Asian Herpetological Research*, 4(3), 197–201.

Wellehan, J. F. X. & Divers, S. J. (2019). Bacteriology. In: S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptiles and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd Ed., pp. 235-246). Saint Louis: Elsevier.

Yak, R., Lundin, A.-C., Pin, P. Y., & Sebatin, S. J. (2015). Oral Bacterial Microflora of Free-Living Reticulated Pythons (*Python reticulatus*) in Singapore. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 25(1–2): 40-44.

Zancolli, G., Mahsberg, D., Sickel, W., & Keller, A. (2015). Reptiles as Reservoirs of Bacterial Infections: Real Threat or Methodological Bias?. *Microbial Ecology*, 70(3): 579–584.

Anexo

Anexo 1 – Legenda de abreviaturas dos detalhes bioquímicos da bactéria *gram + não identificada*.

Poço	Teste	Mnemônica
2	D-AMIGDALINA	AMY
4	FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C	PIPLC
5	D-XILOSE	dXYL
8	ARGININA DIHIDROLASE 1	ADH1
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL
11	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU
13	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	APPA
14	CICLODEXTRINA	CDEX
15	L-Aspartato ARILAMIDASE	AspA
16	BETA GALACTOPIRANOSIDASE	BGAR
17	ALFA-MANOSIDASE	AMAN
19	FOSFATASE	PHOS
20	Leucina ARILAMIDASE	LeuA
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA
24	BETA-GLUCURONIDASE	BGURr
25	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL
26	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR
28	Alanina ARILAMIDASE	AlaA
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA
30	D-SORBITOL	dSOR
31	UREASE	URE
32	RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B	POLYB
37	D-GALACTOSE	dGAL
38	D-RIBOSE	dRIB
39	Alcalinização L-LACTATO	ILATk
42	LACTOSE	LAC
44	N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA	NAG
45	D-MALTOSE	dMAL
46	RESISTÊNCIA À BACITRACINA	BACI
47	RESISTÊNCIA À NOVOBIOCINA	NOVO
50	CRESCIMENTO EM NaCl A 6,5%	NC6,5
52	D-MANITOL	dMAN
53	D-MANOSE	dMNE
54	METIL-B-D-GLUCOPIRANOSÍDEO	MBdG
56	PULULANO	PUL
57	D-RAFINOSE	dRAF
58	RESISTÊNCIA AO O/129 (comp.vibrio.)	O129R
59	SALICINA	SAL
60	SACAROSE/SUCROSE	SAC
62	D-TREALOSE	dTRE
63	ARGININA DIHIDROLASE 2	ADH2s
64	RESISTÊNCIA À OPTOQUINA	OPTO