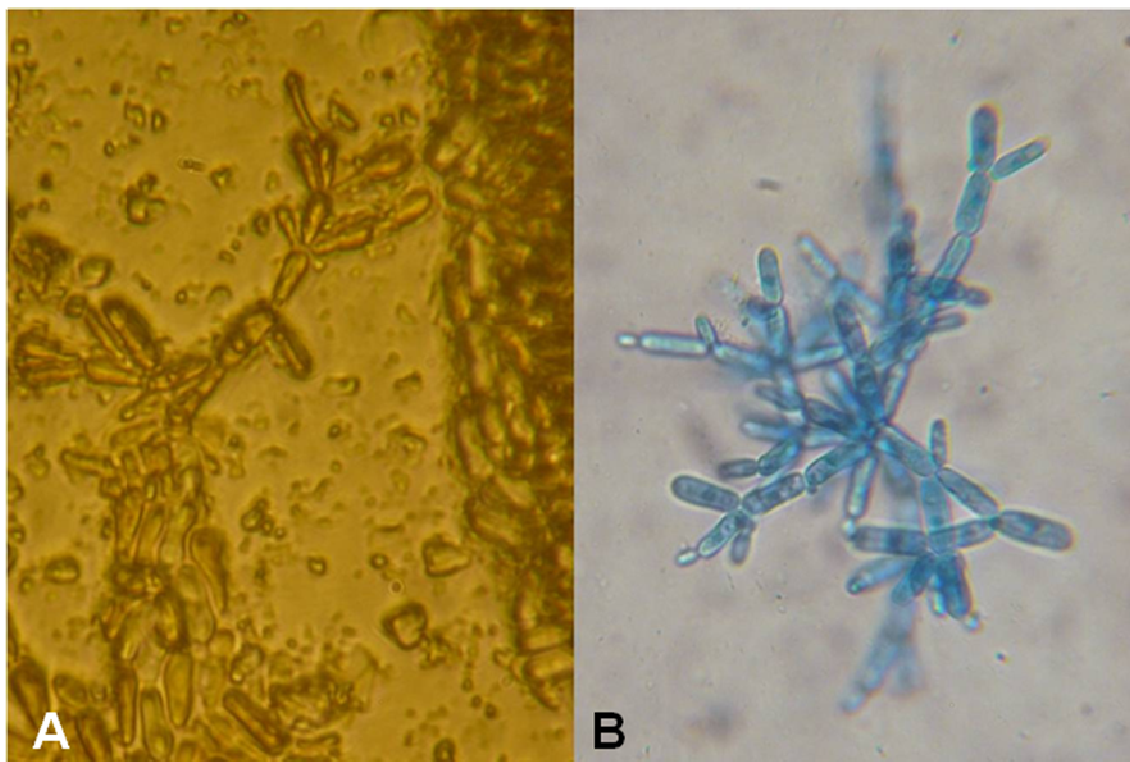


## 4 RESULTADOS

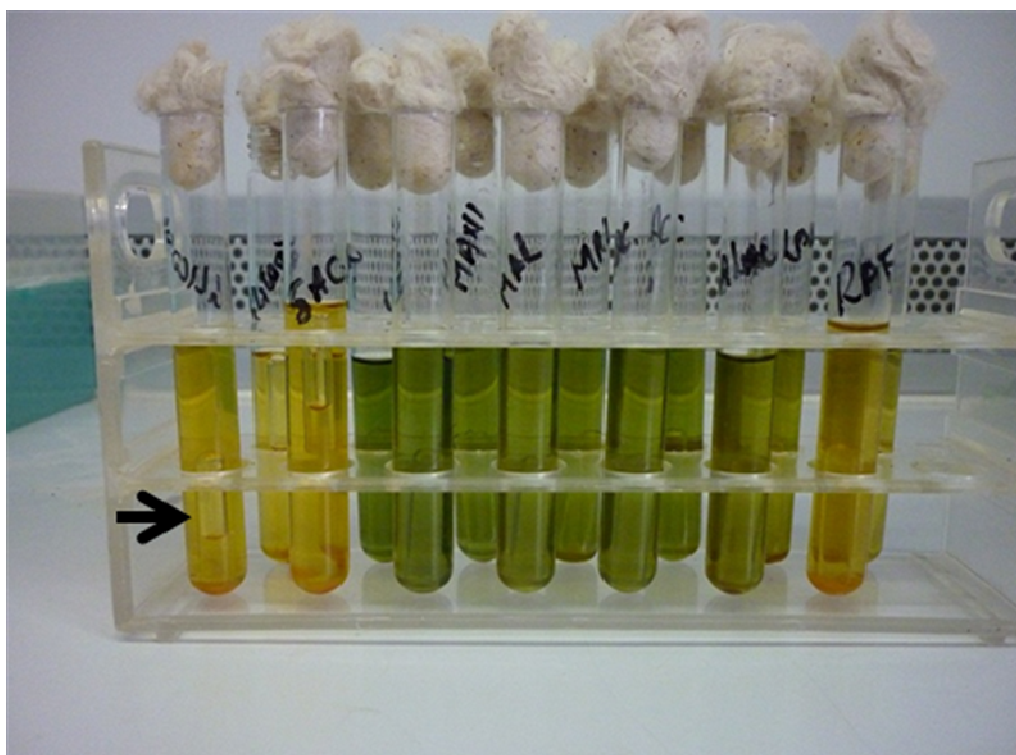
### 4.1 MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE *Cyniclomyces guttulatus*

As amostras identificadas pelo exame de suspensão de fezes como suspeitas positivas para *C. guttulatus* foram submetidas ao crescimento em meios líquidos (YPG) e sólidos (YPGA). As colônias das culturas de leveduras apresentaram crescimento de colônias morfológicamente parecidas com as descritas como *C. guttulatus* conforme mostrado na figura 1.



**Figura 1.** Borda de colônias de *Cyniclomyces guttulatus* em meio YPGA e visualizadas por microscopia ótica invertida (A). Obj. 10X; e células de *C. guttulatus* em caldo YPG. Azul de Algodão. Obj. 40X (B).

No teste de fermentação, foram testados os seguintes açúcares: glicose, sacarose, maltose, manitol, lactose, galactose e rafinose com os leveduriformes que apresentavam características morfológicas correspondentes a *C. guttulatus*. Podemos observar na figura 2 que glicose e sacarose apresentaram fermentação neste teste. Galactose e rafinose apresentaram uma fermentação mais fraca (Tabela 1). Essa fermentação pode ser visualizada, na figura 2, pela mudança de cor e com e a formação de bolhas que indicou a produção de gás (indicado pela seta).



**Figura 2.** Fermentação de carboidratos com isolados de coelho. Tubos com coloração amarela apresentam fermentação.

**Tabela 3.** Fermentação dos carboidratos para culturas de *Cyniclomyces guttulatus* isolados de Cão e Coelho.

Amostras	Glicose	Sacarose	Maltose	Manitol	Lactose	Galactose	Rafinose
<b>CF3(Thor)</b>	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
<b>CF2(Lalá)</b>	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	++ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	+ / Gás	-	-	-	+ / gás	+ / gás
	++ / gás	+ / gás	-	-	-	+	+ / gás
<b>Coelho</b>	++ / gás	+ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	+ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	+ / gás	-	-	-	+	+ / gás
	++ / gás	+ / gás	-	-	-	+	+ / gás

++ forte fermentação; + baixa fermentação; Gás - houve produção de gás.

Os dados da comparação dos resultados do zimograma de *C. guttulatus* com outras espécies associadas a cães estão apresentados na tabela 2.

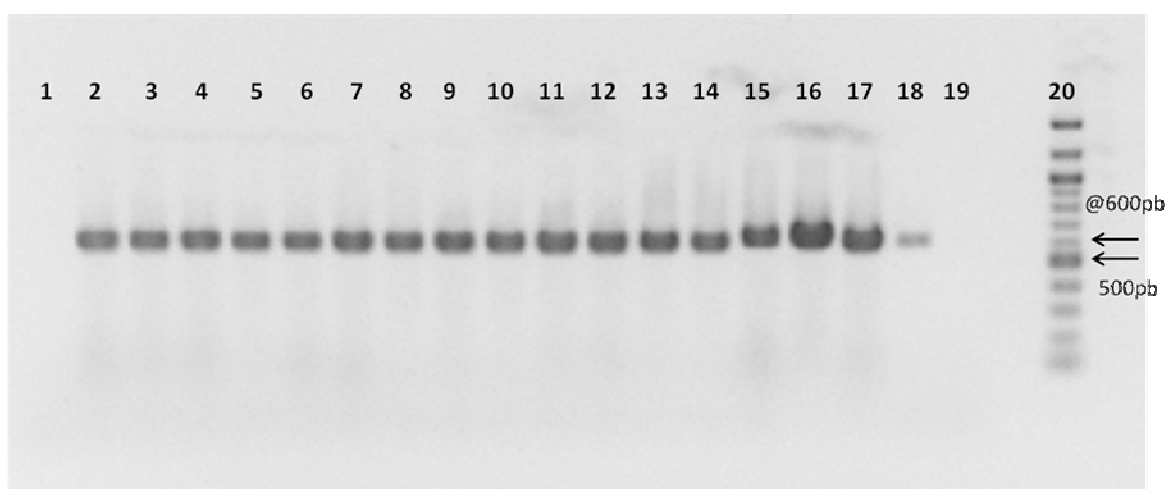
**Tabela 4.** Padrão de fermentação para as leveduras da microbiota de cães.

Microorganismo	Açúcares						
	Glicose	Sacarose	Maltose	Manitol	Lactose	Galactose	Rafinose
<i>C. guttulatus</i>	+	+	-	-	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	V	NA	-	-	+
<i>C. albicans</i>	+	-	+	NA	NA	+	NA
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	NA	NA	+	NA
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-

+ tem fermentação - não tem fermentação v variável NA não se aplica. Adaptado de Brito, 2005 e Rocha, 2006.

## 4.2 PCR

A amplificação por PCR (região do domínio D1-D2) gerou um fragmento de aproximadamente 630pb para todas as culturas representativas de leveduras presentes na microbiota natural de cães e os isolados de *C. guttulatus* (Figura 3)



**Figura 3.** Gel de Agarose 1,5% TAE 1x corado com brometo de etídio da PCR para as leveduras presentes na microbiota de cães: 1 - Controle Negativo (água dentro), 2 - *Saccharomyces cerevisiae* (cepa A), 3 - *S. cerevisiae* (cepa B), 4 - *S. cerevisiae* (cepa C), 5 - *Candida albicans* (cepa A), 6 - *C. albicans* (cepa B), 7- *Candida parapsilosis* (cepa A), 8 - *C. parapsilosis* (cepa B), 9- *Candida tropicalis* (cepa A), 10- *C. tropicalis* (cepa B), 11 - *Rhodotorula* sp (cepa A), 12- *Rhodotorula* sp. (cepa B), 13- CL1, 14-CL2, 15-CF1, 16-CF2, 17-CF3, 18- CF4, 19- Controle Negativo (água fora), 20- Marcador 100pb (New England Biolabs).

### 4.3 PCR-RFLP (gene 26s rDNA região D1-D2)

Após a confirmação de tamanho do amplicon gerado na PCR para a região D1/D2 do gene 26s rDNA, com aproximadamente 630pb, foi realizada a técnica de PCR-RFLP para identificação dos isolados de *C. guttulatus*.

Para isso foi necessário um passo auxiliar que foi a análise *in silico* com o auxílio do programa NEB cutter 2.0 para os corte com enzimas de restrição. Nesta análise foram testadas as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *MspI*, *NdeI*, *RsaI*, *SspI* e *SstI* e as sequências previamente depositados no GenBank para a região do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA.

Observou-se a existência dos padrões de banda diferentes nos cortes *in silico* para as leveduras da microbiota gastrointestinal de cães e para *C. guttulatus*. Baseado nesta análise, foram escolhidas as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII* e *MspI*, conforme mostrado no quadro 1 para diferenciar *C. guttulatus* de outras leveduras através dos padrões de banda gerados. Com essas enzimas também é possível diferenciar as leveduras da microbiota de cão entre si.

**Quadro 1.** Comparação do padrão de bandas geradas para o produto de PCR 26S rDNA (Domínio D1-D2) com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* no programa NebCutter 2.0 (New England Biolabs)

DNA / Enzima	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
<i>Cyniclomyces guttulatus</i> (U76196.1)	327, 164, 77, 66	456, 173	388, 96, 83, 40, 27
<i>C. guttulatus</i> coelho (JQ861267)	326, 163, 77, 37, 28	436, 178, 18	386, 95, 83, 40, 27
<i>C. guttulatus</i> cão (JQ861266)	328, 164, 77, 66	457, 178	388, 97, 83, 40, 27
<i>C. guttulatus</i> cobaio (KC484339)	326, 163, 85, 44, 29	443, 186, 18	386, 96, 91, 40, 34
<i>Malassezia pachydermatis</i> (DQ915500.1)	211, 189, 176, 40	--	--
<i>Candida tropicalis</i> (JN088216.1)	290, 212, 69, 61	227, 225, 162, 18	--
<i>Candida albicans</i> (HQ876051.1)	365, 212, 59	301, 168, 149, 18	245, 172, 151, 68
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JQ219350.1)	293, 211, 93, 37	322, 184, 128	607, 27
<i>Rhodotorula</i> sp (EU872490)	536, 44, 33	445, 168	495, 118
<i>Pichia kudriavzevii</i> (KC143811)	349, 197, 49, 29	237, 216, 70, 68, 33	425, 199

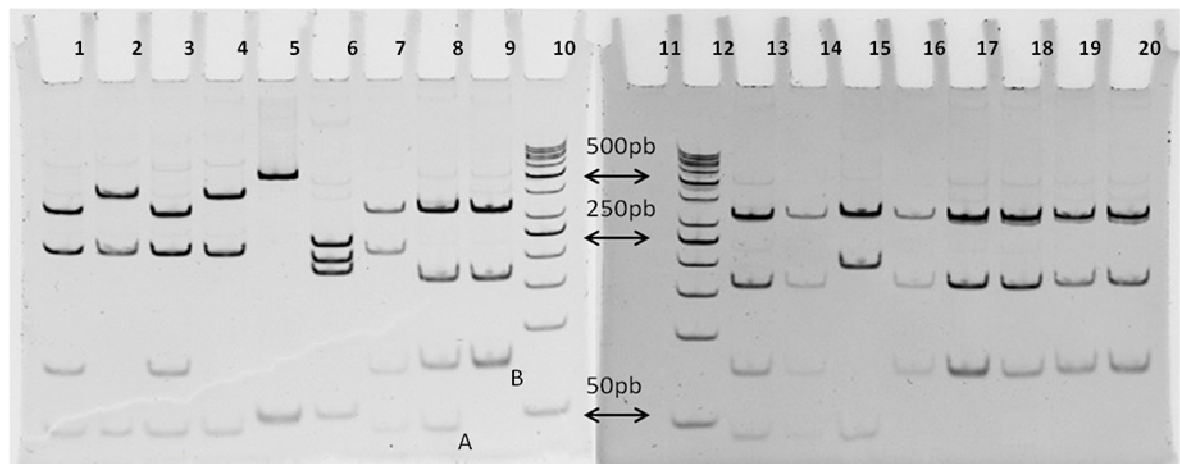


Depois da PCR 150ng de DNA foi cortado com cada uma das três enzimas de restrição selecionadas. A separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% pois esta concentração se mostrou melhor para resolução dos fragmentos. Porém os fragmentos de menor tamanho (abaixo de 30 pb) não foram considerados para diferenciação das espécies (Tabela 5).

Na análise dos géis foi usado o programa Quantity One (BioRad, versão 4.6.2), onde foi estimado o tamanho em pares de bases (pb) gerados pelos cortes com as enzimas de restrição. Os tamanhos gerados pelos cortes estão expostos na tabela 5. Podemos observar que as amostras identificadas como *C. guttulatus* apresentam dois padrões de fragmentos para a enzima DdeI e padrões únicos para as outras duas enzimas (Tabela 3).

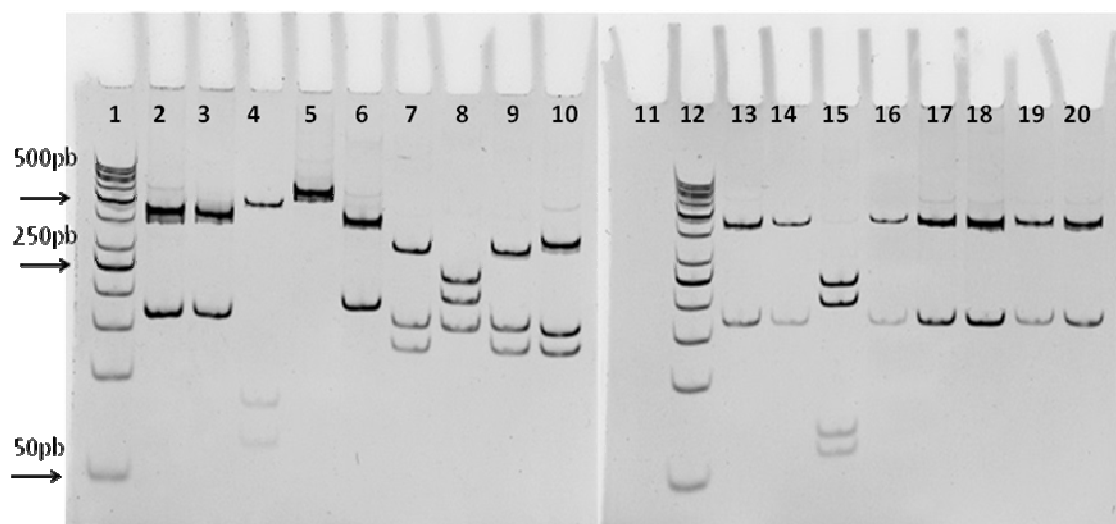
**Tabela 5.** Comparação dos padrões de bandas dos fragmentos de restrição de *Cyniclomyces guttulatus* isoladas de cães e das leveduras presentes na microbiota de cães, gerados usando as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI*

Amostras	Enzimas		
	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
CL1	328, 168, 78	452, 175	390, 99, 81, 40
CL2	326, 167, 77	461, 178	394, 100, 81, 40
CF1 (Tequila)	321, 162, 75, 45	458, 176	400, 99, 79, 40
CF2 (Lalá)	323, 163, 75	465, 178	397, 99, 80, 40
CF3 (Thor)	326, 163, 76	475, 178	395, 99, 80, 40
CF4 (Cão novembro)	328, 163, 75	458, 178	393, 100, 80
R9	328, 163, 75, 45	448, 175	393, 99, 81, 39
<i>C. guttulatus</i> cão (JQ 861266)	321, 159, 72, 43	426, 167	380, 97, 79, 40
<i>C. guttulatus</i> coelho (JQ 861267)	323, 161, 75	442, 168	382, 97, 79, 40
<i>S. cerevisiae</i>	300, 206, 69, 41	307, 142, 120	588
<i>C. albicans</i>	382, 205, 42	287, 146, 122	252, 160, 133
<i>C. tropicalis</i>	307, 204, 68, 41	222, 187, 147	597
<i>C. albicans</i>	377, 203, 42	293, 153, 124	253, 161, 132, 71
<i>Rhodotorula</i> sp.	496, 47	386, 178	418, 167
<i>M. pachydermatis</i>	222, 190, 170, 48	556	592
Levedura X	338, 196, 45	245, 206, 73, 64	412, 186
<i>Kazachstania</i> sp	319, 206, 69, 43	478, 82, 62	483, 129

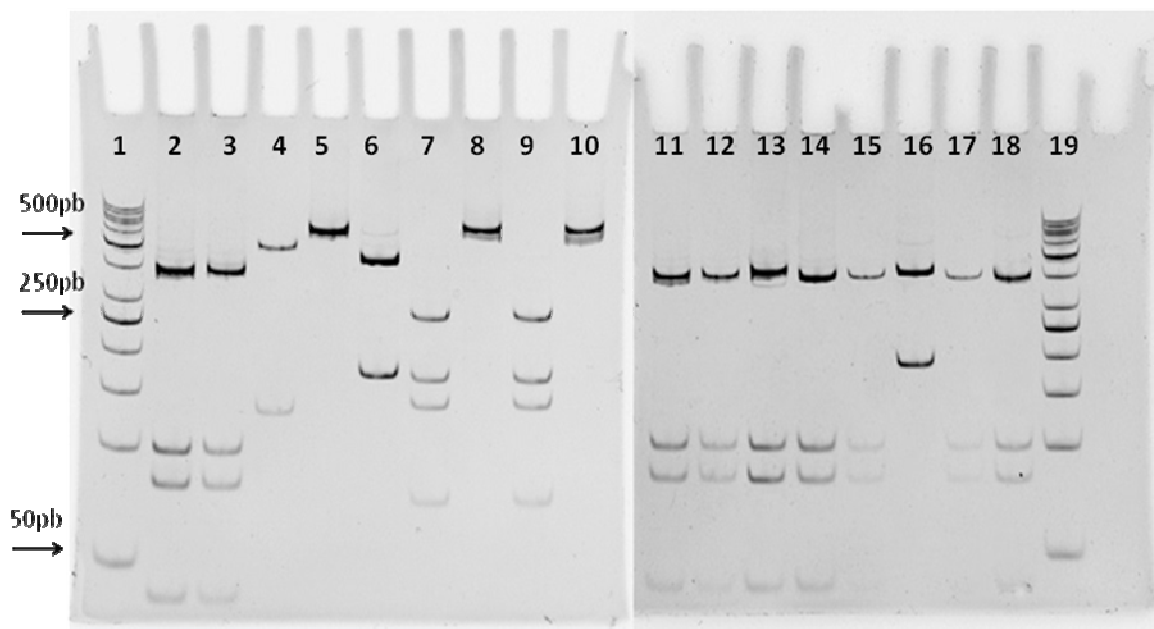


**Figura 4.** Padrão de bandas das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima *DdeI*. 1 - *S. cerevisiae*, 2 - *Candida albicans*, 3 - *Candida tropicalis*, 4 - *C. albicans*, 5 - *Rhodotorula* sp., 6 - *Malassezia pachydermatis*, 7 - *Kazachstania* sp., 8 - *C. guttulatus* Coelho (R2), 9 - *C. guttulatus* Cão (Husky), 10 - Marcador 50pb Thermo Scientific, 11 - sem amostra, 12 - Marcador 50pb Thermo Scientific, 13 - *C. guttulatus* R9, 14 - *C. guttulatus* CF4, 15 - Levedura X, 16 - *C. guttulatus* CF3, 17 - *C. guttulatus* CF2, 18 - CF1, 19 - *C. guttulatus* CL1, 20 - *C. guttulatus* CL2

Como mostrado na figura 4, todas as leveduras apresentaram ao menos um ponto de corte para a enzima *DdeI*. Foi observado que é possível a diferenciação de *C. guttulatus* de todas as outras leveduras analisadas. Essa enzima confirmou a diferença entre os isolados de *C. guttulatus* que foram identificados na análise *in silico*. A presença de uma banda de 45pb (A), no caso de *C. guttulatus* coelho (R2) localizado na coluna 8, *C. guttulatus* R9 coluna 13 e no isolado CF1 (Tequila) que foi acompanhado por uma redução na intensidade da banda dupla de aproximadamente 70pb (B). A banda de 45pb foi gerada a partir de uma das bandas de aproximadamente 70pb, junto com uma banda de aproximadamente 30pb que foi pequena demais (ou sua intensidade foi fraca) para ser visualizada no gel. Observando as outras espécies de leveduras no gel, notamos que a digestão com este enzima não era capaz de permitir a diferenciação entre *S. cerevisiae* (Coluna 1), *C. tropicalis* (Coluna 3) e *Kazachstania* sp (Coluna 7).



**Figura 5.** Padrão de bandas das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima *Hae III*. 1-Marcador 50pb Thermo Scientific, 2 - *Cyniclomyces guttulatus* Cão (Husky), 3 - *C. guttulatus* Coelho (R2), 4- *Kazachstania* sp, 5 - *Malassezia pachydermatis*, 6- *Rhodotorula* sp.,7 - *Candida albicans*, 8 - *Candida tropicalis*, 9 - *C. albicans*, 10 - *Saccharomyces cerevisiae*, 12-Marcador 50pb Thermo Scientific, 13-*C. guttulatus* R9, 14- *C. guttulatus* CF4, 15-Levedura X, 16 - *C. guttulatus* CF3, 17- *C. guttulatus* CF2, 18 - *C. guttulatus* CF1, 19 - *C. guttulatus* CL1, 20 - *C. guttulatus* CL2.



**Figura 6.** Perfil molecular das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima *Msp I*. 1-Marcador 50pb Thermo Scientific, 2-*Cyniclomyces guttulatus* Cão (Husky), 3- *C. guttulatus* Coelho (R2), 4- *Kazachstania* sp, 5- *M. pachydermatis*, 6- *Rhodotorula* spp.,7- *C. albicans*, 8- *C. tropicalis*, 9- *C. albicans*, 10- *S. cerevisiae*, 11-*C. guttulatus* CL1, 12-*C. guttulatus* CL2, 13-*C. guttulatus* CF1, 14-*C. guttulatus* CF2, 15-*C. guttulatus* CF3, 16-Levedura X, 17-*C. guttulatus* CF4, 18-*C. guttulatus* R9, 19-Marcador 50pb Thermo Scientific.

Com a enzima *HaeIII* (Figura 5), foi observado que o padrão de bandas gerado por *C. guttulatus* pode ser confundido com o padrão de *Rhodothorula* sp. Diferente da enzima *DdeI*, esta não apresentou diferenças entre os isolados de *C. guttulatus*. Esta enzima também não foi eficiente para diferenciar *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *M. pachydermatis* que não tiveram seu amplicon cortado.

A digestão com a enzima *MspI* (Figura 6), gerou um único padrão de bandas (Tabela 5) para os isolados de *C. guttulatus* que permitiu a diferenciação das outras espécies de leveduras. Assim como a enzima *HaeIII*, e previsto nas análises *in silico*, esta enzima não corta os amplicons gerados para as espécies *M. pachydermatis* (Coluna 5), *S. cerevisiae* (Coluna 10) e *C. tropicalis* (Coluna 8).

Quando comparados como um todo, os padrões de bandas obtidos experimentalmente foram similares aos previstos no programa NEB cutter. As diferenças encontradas nas análises ocorrem pelo fato que as sequências usadas na análise *in silico* eram parciais, sendo assim menores que as sequências amplificadas na digestão experimental. Assim, os padrões de bandas gerados pelas três enzimas de restrição escolhidas nos permitem diferenciar *C. guttulatus* das outras leveduras. Porém se usarmos apenas as enzimas *Dde I* e *Msp I* podemos diferenciar todas as leveduras, utilizadas no estudo.

## 4.4 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

### 4.4.1 Análises das sequências de coelhos

Um total de 15 culturas (Quadro 3), isoladas de fezes (10 amostras) e conteúdo estomacal (5 amostras) de duas populações de coelhos de laboratório (previamente identificadas como *C. guttulatus* através da técnica de PCR-RFLP descrita anteriormente), foram sequenciados. Destas sequências foram retiradas as regiões correspondentes ao iniciadores e esta análise mostrou a existência de três grupos ("Sequence Types" - ST's) denominados ST1 (591 pb), ST2 (589pb) e ST3 (591pb).

A maioria (10/15) dos isolados pertencem ao grupo ST2 (Tabela 2). Esse grupo apresenta 100% de similaridade com a sequência (número de acesso no GenBank JQ861267), derivada da cultura de *C. guttulatus* isolada de um coelho no Brasil e descrita por nosso grupo de trabalho em 2012 (Flausino et al., 2012) e 100% de similaridade dos nucleotídeos com a sequência (número de acesso no GenBank KC484339) obtida de uma cultura de *C. guttulatus* isolada das fezes de um porquinho da índia brasileiro (*Cavia porcellus*) e depositada no GenBank pelo nosso grupo de pesquisa em 2013. Como demonstrado na tabela 2, esse grupo foi encontrado nas duas populações de coelhos (LQEPV e IZ/UFRRJ) e o único encontrado nas amostras de conteúdo estomacal.

Os grupos ST1 e ST3 apresentaram-se bem parecidos (99% de similaridade) e mostraram um total de 6 nucleotídeos de diferença dentre os 591 pb analisados. Os dados do BlastN mostraram que esses dois grupos possuem um alto grau de similaridade com a sequência (número de acesso no GenBank JQ689012), obtida da cepa tipo de coelho (NRRL Y-17561), que foi isolada de um coelho nos EUA.

O grupo ST1, foi o grupo predominante (4/7 culturas) nas amostras recuperadas das fezes coletadas na população 1 (Quadro 3). Em contraste, esse grupo não foi observado nas

amostras da população 2. Esse grupo mostrou 98,5% de similaridade (9 nucleotídeos de diferença dentre os 591 pb examinados) para a cepa tipo de coelho (NRRL Y-17561).

O grupo ST3 foi observado em apenas uma amostra de fezes de um coelho da população 2 (Quadro 3), e mostrou uma diferença de 7 nucleotídeos quando comparada com a sequência de coelho JQ689012 e 98,8% de similaridade com sequência depositado da cepa tipo (Tabela 4).

**Tabela 6.** Comparação das diferenças de nucleotídeos para a sequência de coelho depositada no GenBank (JQ689012) para os amplicons gene 26S rDNA com os três grupos (Sequence Types) identificados nas amostras de coelho utilizadas neste estudo

Top Sequence	JQ689012	ST1	ST3	ST2	Total
552 C				T	1
529 C				T	1
521 G				C	1
518 G		T		A	2
517 A		G		G	2
493 A		G		G	2
483 G				A	1
475 C				A	1
428 A		:	:	:	3
427 T		G	G	G	3
425 A				:	1
424.1 :		A	A	G	3
418 A		G	G	G	3
411 G		A		A	2
203 C				T	1
190 N		G	G	G	3
187 G				A	1
185 G				:	1
183 C			G	G	2
182 T				A	1
179 G			A	A	2
118 C				T	1
76 T				A	1
75 C				A	1
25 G				A	1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>41</b>

As análises das variações de nucleotídeos, denominada avaliação do número e da posição relativa das diferenças de nucleotídeos, usando uma sequência conhecida como sequência de referência, foi realizada utilizando o programa Sequencer e os resultados dessa análise está exposto na tabela 4. Quando comparamos os grupos ST1 e ST3 com a sequência JQ689012 é observado que as diferenças de 5 nucleotídeos incluindo a deleção da base na posição 428 foi comum para os 2 grupos (destacado em amarelo na tabela 4). Interessante observar que, essas mesmas cinco diferenças, também foram observadas no grupo ST2. Além disso, foi observado que três dos quatro outros nucleotídeos diferentes observados no grupo ST1 também estão presentes no grupo ST2. A quarta diferença (uma substituição de G por T na posição 518) não foi observado no grupo ST2. Contudo, o grupo ST2 tem uma substituição de nucleotídeo (G por A) na mesma posição. As outras duas diferenças encontradas no grupo ST3, também foram vistas no grupo ST2. O grupo ST2 mostrou um total de 14 substituições únicas quando comparado com as outras três sequências e duas deleções o que explico o tamanho reduzido dessa sequência (589pb).

#### 4.4.2 Análise das sequências de Cães

As sequências foram obtidas, para o domínio D1-D2, de sete isolados de *C. guttulatus* de fezes e lavado estomacal de cães (Quadro 2). A análise das sequências mostrou que seis deles eram parecidos uns com os outros e com os grupos ST1 e ST3 identificados nas análises dos isolados de coelhos (Tabela 8). Em contraste, o cão CF3 (Tequila) teve um alto grau de similaridade (99,7%) com o grupo ST2 encontrado nos coelhos. A sequência do cão teve o tamanho de 590pb devido a inserção de uma citosina na posição 46. Também foi observado uma diferença na posição 60 onde um G foi substituído por um A na sequência do grupo ST2 (Tabela 5).

**Tabela 7.** Comparação da sequência do cão CF3 (Tequila) com o grupo ST2.

Top Sequence		ST2	CF3	Total
46	:		C	1
60	G		A	1
Total		0	2	2

O isolado cão Husky recuperado em 2011 (DNA cedido pelo Dr. Gilberto Flausino) e o isolado CF4 (recuperado em novembro de 2014) tiveram 100% de homologia com o grupo ST3 (Tabela 8). Os isolados CL1 e CL2 os quais foram isolados de dois cães em 2012 (Furtado et al, 2013), são idênticos e mostraram apenas dois nucleotídeos de diferença quando comparados ao grupo ST1 tendo 99,7% de similaridade. Os cães CF1 (Lala) e CF2 (Thor) também apresentaram alto grau de similaridade (99,8%) com o grupo ST1 apresentando apenas uma única substituição (C por T) na posição 477 (Tabela 6).

**Tabela 8.** Comparação das diferenças de nucleotídeos entre os cães estudados comparados com ST1 and ST3 identificados em coelhos

Top Sequence	husky	CF4	ST3	CL1 e CL2	CF1 e CF2	ST1	Total
173	T			C	C	C	3
177	C			G	G	G	3
405	C				T	T	2
450	T			C			1
477	C				T		1
487	T			C	C	C	3
511	T			C	C	C	3
512	C			A	A	A	3
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>19</b>

Além da análise de variação realizada com as sequências deste estudo, as sequências também foram comparadas com uma sequência de 533pb (número de acesso no GenBank FJ755179) depositada por pesquisadores da Noruega em 2009. Este isolado de *C. guttulatus* foi recuperado de fezes diarreicas de cão. Como mostrado na tabela 7, os isolados de Husky e CF4 (Cão novembro) tiveram oito nucleotídeos de diferença quando comparados com a sequência da Noruega o que equivale a 98,4% de similaridade.

**Tabela 9.** Comparação de cães classificados como grupo ST3 com a sequência FJ755179 (Cão isolado na Noruega)

Top Sequence	FJ755179	husky	CF4	ST3	Total
149	C	T	T	T	3
153	G	C	C	C	3
381	T	C	C	C	3
445	T	G	G	G	3
453	T	C	C	C	3
463	C	T	T	T	3
487	C	T	T	T	3
488	A	C	C	C	3
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>24</b>

Os resultados da variabilidade nucleotídica comparando os isolados de cães CL1, CL2, CF1 e CF2 estão na Tabela 8. Podemos observar que, no caso dos cães CL1 e CL2, temos uma diferença de quatro nucleotídeos quando comparado com a sequência da Noruega o que



corresponde a 99,2% de similaridade. Um alto grau de similaridade (99,8%) foi observado nos isolados CF2 e CF3 que apresentaram apenas um nucleotídeo de diferença para a sequência da Noruega.

**Tabela 10.** Comparação dos Cães CF2, CF3, CL1 e CL2 com a sequência FJ755179 (Cão isolado na Noruega)

Top Sequence		FJ755179	ST1	CF2 e CF3	CL1 e CL2	Total
381	T				C	1
426	T				C	1
445	T		G	G	G	3
453	T		C		C	2
Total		0	2	1	4	7

## 5 DISCUSSÃO

*Cyniclomyces guttulatus* é amplamente reconhecida como um habitante natural do trato digestivo de coelhos, porquinhos-da-Índia, chinchilas, ratos e camundongos. No entanto, as dificuldades associadas com a cultura e a manutenção desta levedura têm servido para limitar as investigações sobre a biologia e potencial patogenicidade deste microorganismo.

Tradicionalmente, o diagnóstico de infecção com esta levedura requer o isolamento a partir de material clínico, como uma cultura pura, seguida por uma análise morfo-fenotípica das colônias. Nas últimas décadas, o uso de técnicas moleculares tem sido aplicado na identificação de culturas provenientes de material clínico incluindo fezes, conteúdo estomacal e vesícula. Essas técnicas são baseadas no isolamento de DNA a partir de culturas puras seguida da análise das sequências de uma região variável (domínio D1/D2) do gene que codifica a subunidade maior (26S) do RNA ribossomal (rRNA).

Existe uma evidência crescente, derivada de estudos na Europa, Ásia, EUA e, mais recentemente, no Brasil, indicando que a levedura *C. guttulatus* tem o potencial de atuar como um agente patogênico, associado com infecções gastrointestinais em cães. Porém, dados relatados por Mandigers et al. (2014), discordam desta evidência pois nas análises de 140 amostras de fezes de cães com doenças gastrintestinais, a presença de *C. guttulatus* nas fezes, ao menos no caso da Holanda, não teve significado clínico. Sendo assim, não era a causa principal da diarreia nos cães. Tendo em vista, a controvérsia sobre o potencial patogênico desta levedura em cães, mostrou-se a necessidade de desenvolvimento de ferramentas que facilitem a identificação desta levedura de material clínico e um melhor entendimento de sua biologia. Os estudos relatados até o momento, apesar de limitados, mostram que os isolados *C. guttulatus* de cães apresentam um elevado grau de divergência em comparação com os isolados de coelhos e porquinho da Índia (FLAUSINO et al., 2012). O presente estudo teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método robusto, rápido e financeiramente viável de identificação de culturas isoladas de cães incluindo aqueles com sintomas de doenças gastrintestinais.

Foram estudadas 22 amostras, incluindo culturas disponíveis em nosso laboratório, quatro novas culturas de cães e 15 novas culturas de coelhos coletadas de duas populações diferentes de coelhos de laboratório. A inclusão dos isolados de coelhos no estudo, foi considerada relevante uma vez que já se tem conhecimento sobre a relação entre esses dois organismos. Porém mesmo com todo o conhecimento sobre a interação entre estes dois organismos, apenas dois isolados (um dos EUA e um do Brasil) foram estudados a nível molecular.

Todos os isolados estudados apresentaram crescimento de colônias com a morfologia de *C. guttulatus* conforme descrito por Saito et al. (1984), Kurtzmann e Robnet (1998), Neel et al. (2006), Flausino e Baroni (2009) e Flausino et al. (2012), Flausino et al. (2013). O zimograma mostrou que todas as amostras fermentaram fortemente glicose e sacarose como também foi observado por Sato et al. (1984), Buecher e Phaff (1972), Kurtzman e Fell (1998), Shifrine e Phaff (1958), Richle e Scholer (1961), Phaff e Miller (1971) e, Flausino e Baroni

(2009). Também foi observada a fermentação de rafinose como descrito pelos mesmos autores, demonstrando que as amostras analisadas eram de *C. guttulatus*. As amostras analisadas também apresentaram uma fraca fermentação de galactose, que não havia sido observado anteriormente. Porém é preciso notar que *C. guttulatus* apresenta o mesmo perfil fermentativo de outros leveduriformes (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) encontrados em cães. Desta maneira não foi possível através desta técnica afirmar que os isolados eram de *C. guttulatus*. Deve-se notar que estudos anteriores realizados em nosso laboratório, foram isolados duas culturas de fezes de cão que mostraram similaridade com *C. guttulatus* quando comparadas morfológicamente. Essas culturas foram identificadas como *Kazachstania* sp. (levedura X) e *Pichia kudriavzevii* através da análise das sequências (Comunicação pessoal Dr. Gilberto Flausino). Essa observação mostra que a identificação baseada na morfologia é limitada e assim torna-se necessário a aplicação de técnicas moleculares para uma identificação definitiva.

O sequenciamento de produtos de PCR fornece uma identificação precisa das culturas, porém seu custo elevado e alto nível de habilidade técnica, para realização da técnica e análise das sequências, torna o uso desta inviável como rotina nos laboratórios. Em contrapartida, uso de técnicas alternativas e financeiramente viáveis para análise de produtos de PCR devem ser utilizadas como uma análise preliminar dos isolados a fim de ser obter um grupo representativo de amplicons para sequenciamento. Um método alternativo é o PCR-RFLP baseado na digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR gerando uma série de fragmentos de diferentes tamanhos, que são resultantes de mutações, deleções ou inserções nos sítios de restrição. O DNA digerido é separado por eletroforese em gel (agarose ou poliacrilamida) e as imagens são utilizadas para análise dos padrões de bandas gerados (RAMESHKUMAR et al., 2012).

As amostras consideradas positivas para *C. guttulatus* tiveram seu DNA extraído, junto com as culturas de outras espécies de leveduras previamente identificadas e descritas como componentes da microbiota de cães (BRITO et al., 2009). Em seguida, realizou-se amplificação do gene 26S rDNA região do domínio D1/D2 gerando um amplicon (produto da PCR) de aproximadamente 630pb. Baseado na análise *in silico* realizada neste estudo, usando amplicons depositados no GenBank, foi selecionada as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* para o estabelecimento de um protocolo de PCR-RFLP capaz de identificar *C. guttulatus*.

Os padrões de bandas observados nos géis de poliacrilamida para todos os isolados suspeitos de *C. guttulatus* corresponderam ao padrão previsto na análise *in silico*. A separação das bandas por eletroforese demonstrou que existem dois padrões de bandas possíveis para *C. guttulatus* quando corta-se um amplicon de aproximadamente 630pb com a enzima *DdeI*. Essa observação sugere que o PCR-RFLP foi capaz de identificar a variação intra específica do domínio D1/D2 reportada anteriormente por Flausino et al. (2012). Em contrapartida, as outras duas enzimas não foram capazes de separar os dois grupos de sequências. Assim como a enzima *DdeI*, a enzima *MspI* conseguiu fornecer um padrão claro suficiente para identificação de *C. guttulatus*. Enquanto, a enzima *HaeIII* não conseguiu diferenciar *C. guttulatus* de *Rhodotorula* sp.

Baseado nestes dados, um método de identificação de *C. guttulatus* foi proposto baseado na digestão do amplicon gerado para o domínio D1/D2 com as enzimas *DdeI* e *MspI*. Este método usou um alvo comumente empregado para análises molecular de leveduras (KURZTMAN; ROBNETT, 1998; GARNER et al., 2010) e permite uma rápida identificação (24 a 48 horas) de isolados de *C. guttulatus*. Este método tem baixo custo e é uma alternativa tecnicamente viável ao sequenciamento.

O método de PCR-RFLP mostrou-se eficiente para a identificação diferencial dos isolados de *C. guttulatus* e permitiu o reconhecimento de variações nas sequências entre os isolados. Porém a análise através do PCR-RFLP se mostrou limitada na detecção de polimorfismos específicos e foi incapaz de fornecer informações detalhadas em relação a variação de nucleotídeos ao longo da sequência (gene ou produto de PCR). Para suprir essa limitação, foi necessário a realização do sequenciamento a fim de determinar as diferenças nos nucleotídeos.

Primeiramente, foram sequenciados os amplicons de 15 isolados de *C. guttulatus* coletados de duas populações distintas de coelhos mantidas em laboratórios da UFRRJ. Essa análise revelou a existência de três grupos distintos (Sequence Types: ST1, ST2 e ST3). Dois desses grupos, ST1 e ST3 foram bem similares entre si apresentando um total de seis nucleotídeos de diferença entre os 591pb sequenciados. Essas diferenças, não afetaram o padrão de bandas gerados pelas enzimas usadas no PCR-RFLP para os isolados suspeitos de *C. guttulatus*. Quando esses grupos foram comparados com a sequência (JQ689012) obtida de um coelho nos EUA, foi observado que ST1 apresentava oito nucleotídeos de diferença (98,7% de similaridade) e que o grupo ST3 apresentava seis nucleotídeos de diferença (99% de similaridade).

Todos os isolados que produziram o segundo padrão de bandas (caracterizado pela presença de uma banda de aproximadamente 45pb) com a enzima *DdeI*, pertencem ao grupo ST2. Este grupo mostrou uma diferença de 18 nucleotídeos (96,9% de similaridade) em comparação com o grupo ST1, 19 diferenças de nucleotídeos quando comparado com o grupo ST3 (96,8% de similaridade) e 23 diferenças de nucleotídeos para a sequência do coelho americano JQ689012 (96,1% de similaridade). Os níveis de polimorfismos observados nos 600pb do domínio D1/D2 na sequência do grupo ST2 (e em menor escala para os grupos ST1 e ST3) foram substancialmente maiores que os níveis descritos para outras espécies de ascomicetos, onde a divergência no número de nucleotídeos entre cepas tipos e isolados co-específicos geralmente foi menor que três nucleotídeos, chegando ao máximo de seis nucleotídeos em algumas espécies (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Concluímos que ST1 e ST3 são isolados intimamente relacionados com a cepa tipo e que os isolados do grupo ST2 podem representar uma espécie diferente ou sub-espécie de *Cyniclomyces*.

As análises das sequências vindas do isolados de cães revelou que dois dos isolados (Husky e CF4) foram idênticos ao grupo ST3. Os outros quatro isolados mostraram apenas um ou dois nucleotídeos de diferença para o grupo ST1. Em contrapartida, o isolado CF3 mostrou apenas dois nucleotídeos de diferença (99,7%) de similaridade quando comparado ao grupo ST2. Assim, todos os três grupos identificados nos coelhos também foram encontrados nos isolados de cães. Para completar as análises, os isolados foram comparados com uma sequência de cão da Noruega (a única sequência não brasileira de cão depositada no GenBank). Essa sequência mostrou 99,8% de similaridade com o grupo ST1, 98,5% de similaridade com ST3 e 97,9% de similaridade com a sequência tipo de coelho. Como tal, foi agrupado com a maioria dos isolados de cães deste estudo.

Vale a pena considerar a possibilidade de o gênero *Cyniclomyces* ter de fato mais de uma espécie como sugerido por Gjerde et al. (2009), onde foram registrado um total de 11 substituições de nucleotídeos (em mais de 533 nucleotídeos) entre o isolado norueguês (FJ755179) e a cepa tipo de coelho NRRL/Y17561. No entanto, para avaliar esta possibilidade será necessário estender a análise genética destes isolados utilizando uma abordagem de sequenciamento de múltiplos genes (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; KURTZMAN et al., 2005; SUH et al., 2006; AMSELEM et al., 2011). Esta estratégia pode

ser considerada como essencial, a fim de evitar que se chegue a uma conclusão errada através de análise filogenética baseada em uma única sequência.

Neste contexto, dez versões diferentes do domínio divergente D1/D2 da subunidade maior (26S) do DNA ribossomal foram identificadas entre os membros da espécie de levedura ascomiceta *Clavispora lusitaniae*. Os polimorfismos foram independentes um do outro e várias estirpes eram heterogêneas para um ou mais dos polimorfismos. Estas observações sugerem cautela na utilização de divergência, nesta sequência única, como o principal critério para a delimitação das espécies de levedura (LACHANCE, et al., 2003). Assim, as sequências de quatro *loci* adicionais, especificamente a subunidade menor (18S) do gene do RNA ribossomal (rRNA), o gene que codifica o fator de alongamento-1<sup>a</sup> (EF-1a), juntos com a maior e a segunda maior, subunidades do gene que codifica o RNA polimerase II (RPB1 e RPB2) têm sido relatadas como importantes marcadores filogenéticos aplicado com êxito à filogenia de leveduras (SUH et al., 2006; AMSELEM et al., 2011).

Em síntese, foi observado que a identificação tradicional baseada em características morfológicas e fenotípicas foi inadequada para a identificação definitiva de *C. guttulatus*. Em contrapartida, a técnica de PCR-RFLP desenvolvida neste estudo forneceu um meio de identificar esta levedura e permitiu a detecção de duas variantes genéticas. As análises detalhadas das sequências do domínio D1/D2 mostrou a existência de três grupos. Dois deles são intimamente relacionados um ao outro e a cepa tipo de coelho. O terceiro grupo mostrou uma grande variação na sequência e pode representar uma nova espécie.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE *Cyniclomyces guttulatus*

A identificação através das características morfológicas e fenotípicas foi incapaz de fornecer uma identificação definitiva dos isolados suspeitos de ser *C. guttulatus*.

### 6.2 PCR-RFLP (Gene 26s rDNA região do domínio D1/D2)

Identificação de *C. guttulatus* pode ser realizada utilizando a técnica de PCR-RFLP, com base na digestão (com as enzimas *DdeI* e *MspI*) da região do domínio D1/D2 do gene 26S rRNA. O método é eficiente e permite a identificação diferencial de *C. guttulatus* de outras espécies de leveduras associadas com cães.

### 6.3 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

A região do domínio D1/D2 dos isolados analisados neste estudo mostrou grande variação de nucleotídeos e eles foram agrupados em três grupos tipos de sequência (ST's). Devido a grande diferença em número de nucleotídeos do grupo ST2 para os outros (ST1 e ST3) identificados por sequenciamento é provável a existência de uma nova espécie ou subespécie. Um estudo com mais genes deve ser realizado para confirmação.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo VII, 2004. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: Abr 2013.

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v.9, p.47 2010. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>.

ALMEIDA, M.E.S.de; MARTINI, M.H.; PORTO, E.; CAMARGO, A.M.M. de; RIZZO, E.; LACAZ, C. da S., Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n . 3, p. 201-206, 1988.

AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**, v.152, n. 3, p. 269-281, 1996.

AMSELEM, J.; CUOMO, C.A.; VAN KAN, J.A.; VIAUD, M.; BENITO, E.P.; COULOUX, A.; COUTINHO, P.M.; DE VRIES, R.P.; DYER, P.S.; FILLINGER, S.; FOURNIER, E.; GOUT, L.; HAHN, M.; KOHN, L.; LAPALU, N.; PLUMMER, K.M.; PRADIER, J.M.; QUÉVILLON, E.; SHARON, A.; SIMON, A.; TEN HAVE, A.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; WINCKER, P.; ANDREW, M.; ANTHOUARD, V.; BEEVER, R.E.; BEFFA, R.; BENOIT, I.; BOUZID, O.; BRAULT, B.; CHEN, Z.; CHOQUER, M.; COLLÉMARE, J.; COTTON, P.; DANCHIN, E.G.; DA SILVA, C.; GAUTIER, A.; GIRAUD, C.; GIRAUD, T.; GONZALEZ, C.; GROSSETETE, S.; GÜLDENER, U.; HENRISSAT, B.; HOWLETT, B.J.; KODIRA, C.; KRETSCHMER, M.; LAPPARTIENT, A.; LEROCH, M.; LEVIS, C.; MAUCELI, E.; NEUVÉGLISE, C.; OESER, B.; PEARSON, M.; POULAIN, J.; POUSSEREAU, N.; QUESNEVILLE, H.; RASCLE, C.; SCHUMACHER, J.; SÉGURENS, B.; SEXTON, A.; SILVA, E.; SIRVEN, C.; SOANES, D.M.; TALBOT, N.J.; TEMPLETON, M.; YANDAVA, C.; YARDEN, O.; ZENG, Q.; ROLLINS, J.A.; LEBRUN, M.H.; DICKMAN, M. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* - **PLoS genetics**, v.7, n.8, e1002230, 2011.

BARNETT, J.A.; PANKHURST, R.J. **A key for identifying yeasts based on physiological tests**. Amsterdam: Holland Publishing Company, 1974. 273p.

BARNETT, J.A., YARROW, D. **Yeasts, characteristics and identification**. Cambridge University Press, 811p, 2003.

BRILHANTE R.S.N. **Estudo das dermatofitoses canina e felina: Aspectos epidemiológicos e comportamento do *Microsporium canis* frente a diferentes métodos de estocagem**. 2002. 85p. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2002.



BRITO, E.H.S. de. **Caracterização Fenotípica e Perfil de Sensibilidade Antifúngica de Cepas de *Candida* spp e *Malassezia pachydermatis*, Oriundas de Cães.** 2005. 140p. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

BRITO, E.H.S. FONTENELLE, R.O.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; SOARES JÚNIOR, F.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F.. Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 1, p. 147-153, 2007.

BRITO, E.H.; FONTENELLE, R.O.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 320-326, 2009.

BUECHER, E.J. & PHAFF, H.J. Dimorphism In A New Isolate Of *Saccharomycopsis* Schiöningg. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 18, n. 6, p. 901-907, 1972.

CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.142, n. 10, p. 4868–4869, 2004.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M.T.; OTRANTO, D., Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Medical Mycology**, v.44, n. 6, p. 485-492, 2006.

CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.; MADRID, I.M.; FONSECA, A.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**, v.12, n. 2, p.164-168, 2007.

COSTA, P.S da, LOPES, C.W.G.; DE CARVALHO, E.C.Q. Patologia comparativa na infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos tipo carne. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 5, p. 215-218, 2001.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N., Princípios de Estocagem e Preservação de Amostras Microbiológicas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 111-122, 2009.

COSTA, R. de J., Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), 2009, Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecular-pcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>>. Acesso em: 24 Mai 2014

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CARBANES, F.J. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2383-2285, 2000.

DIJKSTRA M., KRAUS J. S., BOSJE J. T, DEN HERTOOG E. Protein-losing enteropathy in Rottweilers. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 135, n. 10, p. 406-412, 2010.

ECHEVERRIGARAY, S., RANDON, M.; DA SILVA, K.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A.P., Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 29, n. 6, p.1019-1027, 2013

ELLIOTT, D.R., WILSON, M., BUCKLEY, C.M.F., SPRATT, D.A. Cultivable Oral Microbiota of Domestic Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p. 5470-5476, 2005

FALAGAS, M.E.; ROUSSOS, N. & VARDAKAS, K.Z. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **Journal of Infectious Disease**, v. 14, n. 11, p. e954–e966, 2010.

FALEIRO, F.G., **Marcadores Genético Moleculares Aplicados a Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos**, Planaltina:EMBRAPA-Cerrados, 2007.102 p.

FARASAT, A.; GHAHRI, M.; MIRHENDI, H.; BEIRAGHI, S. Morphological and Molecular Characteristics of *Candida pulcherrima*, an Opportunistic Yeast, Isolated from Nail Lesions in Iran. **Advanced Studies in Biology**, v. 4, n. 6, p. 297-306, 2012

FELL, J.W., rDNA Target Oligonucleotide Primers for the Identification of Pathogenic Yeasts in a Polymerase Chain Reaction, **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 6, p. 474-477, 1995

FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G., STATZELL-TALMAN, A. Biodiversity and Systematics of Basidiomycetous Yeasts as Determined by Large-subunit rDNA D1/D2 Domain Sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1998. 220 p.

FISHER, M.C.; HENK, D.A.; BRIGG, C.J.; BROWNSTEIN, J.S.; MADOFF, L.C.; MCCRAW, S.L.; GUPRR, S.J. Emerging fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health. **Nature**, v. 484, n.7393, p. 186-194, 2012

FLAUSINO, G. **Identificação fenotípica e genotípica de isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) Van Der Walt e Scott, 1971 e de *Eimeria caviae* Sheather, 1924 procedentes do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*)**. 2013. 113p. Tese (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

FLAUSINO, G.; BARONI F. DE A. Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971) in Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 31, n. 2, p. 100 -103, 2009.

FLAUSINO, G.; LEAL, P. D. S.; McINTOSH, D.; AMARAL, L.G.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Isolation and Characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in Dogs in Brazil. **Current Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 542–546, 2012.

FLAUSINO, G.; FURTADO, T.T.; McINTOSH, D.; TEIXEIRA FILHO, W.L. Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus. *Coccidia*, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2013.

FLEMMING, R.V.; WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J., Emerging and less common fungal pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America*. v. 16, n. 4, p. 915-933, 2002.

FLORES, C.L., RODRÍGUEZ, C., PETIT, T., GANCEDO, C., Carbohydrate and Energy-yielding Metabolism in Nonconventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, n.4, p.507-529, 2000.

FOSTER, M.L.; DOWD, S.E.;STEPHENSON, C.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Characterization of the Fungal Microbiome (mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. *Veterinary Medicine International*, v. 2013, n.23, p. 1 - 8, 2013.

FURTADO T.T., FLAUSINO G., LEAL P.D. de S., FERREIRA J.P., MCINTOSH D., FLAUSINO W., TEIXEIRA FILHO W.L., PAES-DE-ALMEIDA E.C.; LOPES C.W.G. Diagnóstico de Colangite Associado à Mucocele da Vesícula Biliar por *Cyniclomyces guttulatus* Em Cães - Relato De Casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*,v. 35, n.1, p.1 - 6. 2013

GADANHO, M., SAMPAIO, J.P., SPENCER-MARTINS, I. Polyphasic Taxonomy of the Basidiomycetous Yeast genus *Rhodospordium*: *R. azoricum* sp nov. *Canadian Journal of Microbiology*, v.47, n. 3, p. 213-221, 2001

GARNER, C.D., STARR, J.K., McDONOUGH, P.L., ALTIER, C., Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 Region of the Large Ribosomal Subunit; *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 6, p. 2140-2146, 2010.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratório*, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G., Viabilidade de Cepas de *Malassezia pachydermatis* Mantidas em Diferentes Métodos de Conservação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.

GJERDE, B.; HOLTET, L.; SANDEN, S.; DAHLGREN, S.S. Soppen *Cyniclomyces guttulatus* en del av den normale ventrikkel- og tarmfloraen hos kanin. VI beskriver et tilfelle der en morfologisk identisk, men genetisk forskjellig, sopp har gitt residiverende gastroenteritt hos hund. *Norsk Veterinaer Tidsskrift*., v.121, n. 6, p. 507-510, 2009.

GUERRA, J. B.; ARAUJO R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*. v. 33, n. 2, p. 106-111, 2001.

HARRIGAN, W.F., **Laboratory Methods in Food Microbiology**.3.ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 351-359.

HAZEN, K.C., New and Emerging Yeast Pathogens, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, v. 66, n. 4, p. 411-453. 1991

HOWERS, D.J.; BLANKENSTEIN, B. *Cyniclomyces guttulatus* (Brillendoosjesgist) en diarree bij honden. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 126, n. 6, p. 502, 2001.

HUSSEIN, H.S.; FLICKINGER, E.A.; FAHEY, G.C. Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, suppl. 1, p. 1454-1456, 1999.

HUSSEIN, S.H.; SUNVOLD, G.D. Dietary strategies to decrease dog and cat fecal odor components. In: REINHART, G.A.; CAREY, D.P. **Recent advances in canine and feline nutrition**, Wilmington: Orange Frazer Press, v.3, p.153-168, 2000.

IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E., Utilization of the Internal Transcribed Spacer Regions as Molecular Targets to Detect and Identify Human Fungal Pathogens, **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 87-109, 2002.

KANTARCIOGLU, A.S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses**, v. 45, n. 5-6, p. 160-165, 2002.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi**. 10a Ed. Wallingford, CABI. 2008. p. 1-746.

KOBAYASHI, C., Distribution of Yeast-form Fungi in Oral Cavity of Dog, **International Journal of Oral Medical Sciences**, v.7, n.1, p. 40-44, 2008.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam. Elsevier, 1980.1028p.

KURTZMAN, C.P., rRNA Sequence Comparisons for Assessing Phylogenetic Relationship Among Yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 1-6, 1992

KURTZMAN, C.P.; Use of Gene Sequence Analyses and Genome Comparisons for Yeasts Systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, n. 2, p. 325-332, 2014

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1998.1035p.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts- a taxonomic study**. 6. Ed. Editora: Elsevier, 2011.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. **Yeast**, v. 7, n. 1, p. 61-72, 1991

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Identification of Clinically Important Ascomycetous Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 5' End of the Large Subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1216-1223, 1997.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C. P.;ROBNETT, C.J.; WARD, J.M.; BRAYTON, C.; GORELICK, P.; WALSH, T.J.,. Multigene phylogenetic analysis of pathogenic *Candida* species in the *Kazachstania* (*Arxiozyma*) *telluris* complex and description of their ascospore states as *Kazachstania bovina* sp. nov., *K. heterogenica* sp. nov., *K. pintolopesii* sp. nov., and *K.slooffiae* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43,n. 1, p. 101-111, 2003

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Relationships Among Genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from Multigene Phylogenetic Analysis of Type Species. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 1, p. 23-33, 2012.

LEE, Y.W., LIM, S.H., AHN, K.J. The Application of 26S rDNA PCR-RFLP in the Identification and Classification of *Malassezia* Yeast, **Korean Journal of Medical Mycology**, v. 11, n. 3, p. 141-153, 2006.

LIMA, R.F.; BORBA, C.M. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. **Revista Iberoamericana de Micología** v. 18, n. 4, p.191-196, 2001.

MACÊDO, D.P.C.; FARIAS, A.M. DE A.; DE LIMA NETO, R.G.; DA SILVA, V.K.A.; LEAL, A.F.G.; NEVES, R.P. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 42, n. 2, p. 88-191, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10º ed. São Paulo: Pearson Pretice Hall, 2004, 624p.

MAGEE, B.B., D'SOUZA, T.M., MAGEE, P.T., Strain and Species Identification by Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Ribosomal DNA Repeat of *Candida* Species. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, p. 1639-1643, 1987.

MANDIGERS, P.J.; DUIJVESTIJN, M.B.; ANKRINGA, N.; MAES, S.; VAN ESSEN, E.; SCHOORMANS, A.H.; GERMAN, A.J.; HOUWERS, D.J. The Clinical Significance of *Cyniclomyces guttulatus* in Dogs with Chronic Diarrhea, a Survey and a Prospective Treatment Study. **Veterinary Microbiology**. v. 172, n. 1-2, p. 241-247. 2014.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Fefferdo Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARCOS J. Y ; PINCUS, D.H. Fungal Diagnostics: Review of Commercially Available Methods. **Methods in Molecular Biology** n. 968, p. 25-54, 2013.

MATTEL, A. S., MADRID, I.M., SANTIN, R., SCHUCH, L.F.D., MENDES, J., MEIRELES, M.C.A., Efeito antifúngico de agentes químicos sobre leveduras com potencial patogênico isoladas de ambiente hospitalar veterinário, **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 294-299, 2013.

MORAES, A.M.L.de; PAES, R.A.; HOLANDA, V.L.de; **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** - Capítulo 4 Micologia. Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

NEEL, J. A.; TARIGO, J.; GRINDEM, C. B. Gallbladder aspirate from a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 4, p. 467–470, 2006.

PARLE, J.N. The growth of *Sacchacomycopsis guttulata*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 22, n. 3, p. 237-242, 1956.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia. Conceitos e Aplicações**. 2 ed. Editora Pearson Education do Brasil. São Paulo. 1997. 517p.

PEREIRA JR, N., BON, E. P. da S., FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química / UFRJ, 2008.62p.

PETERS, S.; HOWERS, D.J. Een geval diarree geassocieerd met *Cyniclomyces guttulatus* (brillendoosjsgist) bij de kat. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 134, n. 5, p. 198-199, 2009.

PHAFF, H. J.; MILLER, M.W. *Cyniclomyces* Van Der Walt et Scott. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1999, p. 154-156

PHAFF, H.J.; MILLER M.W. *Cyniclomyces* van der Walt et Scott. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1971. p. 125-129.

PHAM, T.; WIMALASENA, T.; BOX, W.G.; KOIVURANTA, K.; STORGARDS, E.; SMART, K.A., GIBSON, B.R., Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery ‘Wild’ Yeast Contaminants. **Journal of the Institute of Brewing** v. 117, n. 4, p. 556-568, 2011.

PINCUS, D.H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S., Yeast Identification - Past, Present and Future Methods, **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 97-121, 2007.

RAMESHKUMAR N., AYYADURAI N., KAYALVIZHI N., GUNASEKARAN P. Genotypic and phenotypic diversity of PGPR fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Microbiology and Biotechnolony**. v. 22, n.1, p.13-24, 2012.

RAMOS, J.P., VALENTE, P., De SOUZA, R.A., ROSA, C.A., LEONCINI, O. Heteroduplex Mobility Assay of the D1/D2 Region of the 26S rDNA for Differentiation of *Saccharomyces* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 3 p. 206-210, 2001.

RANGEL, C.D., **Leveduras Emergentes Causadores de Infecções Invasivas, Metodologia de Identificação e Perfis de Susceptibilidade aos Antifúngicos** 2012. 66p. Monografia(Microbiologia Aplicada as Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

RICHLE, R.; SCHOLER, H.J. *Saccharomycopsis guttulata* Von kaninchen: kulturelle eigenschaften und mögliche bedeatung. **Pathologie und Microbiologie**, v. 24, n. 5, p. 783-793, 1961.

ROCHA, C.D., **Determinação Dos Pontos Críticos De Contaminação Por Leveduras Em Indústria De Refrigerantes**, 2006, 41 p. Dissertação (Microbiologia), 2006 - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SAITO, K.; SAITO, H.; WATANABE, T.; SAITO, H. *Cyniclomyces guttulatus*: it can now be clearly observed in canine feces. Saito Animal Hospital, M.B. Network, Kitasato Institute, 1984.p. 153-196.

SAMPAIO, J.P., GADANHO, M., SANTOS, S., DUARTE, F.L., PAIS, C., FONSECA, A., FELL, J.W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **Internacional Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 687-697, 2001.

SCORZETTI, G.; FELL, J.W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of Basidiomycetous Yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and Internal Transcribed Spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.

SHIFRINE, M.; PHAFF, H.J. Nutritional requirements of *Saccharomycopsis guttulata* (Robin) Schiöning. **Mycologia**, v. 51, n. 3, p. 318-328, 1959.

SHIFRINE, M.; PHAFF, H.J. On the isolation, ecology and taxonomy of *Saccharomycopsis guttulata*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 24, n. 2, p. 193-209, 1958.

SIDRIM, J.J.C., MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara. 1999.266p.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.338.

SILVA, I.F.H.P.L. da, **Tipagem Molecular de Isolados Clínicos e Ambientais de *Cryptococcus neoformans***,2010. 68p. Dissertação (Biociências) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

SILVA, F.H.A. da; PAÇO, F.R.; REIS, E.;AMARAL, V., Infecção por *Saccharomyces cerevisiae* - uma infecção atípica em UTI. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.23, n.1, p.108-111. 2011.



SOLA, C.M.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, S.M., Manutenção de Microorganismo: Conservação de Viabilidade, **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.14, 2012.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282-290, 2009.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, N.; Genetic markers – a cutting edge technology in herb drug research. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 1, p.1 - 18, 2009.

SUH S.O.; BLACKWELL, M.; KURTZMAN, C.P.; LACHANCE, M.A.; Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006-1017, 2006.

TLAMÇANI, Z.; ER-RAMI, M. Fungal Opportunist Infection: Common and Emerging Fungi in Immunocompromised Patients. **Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 1-5, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 920p.

TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2008. 718p.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; Possinger, K.; GÖBEL, U. Identification of Clinically Relevant Yeasts by PCR-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 2, p. 201-211, 2004

VAN DER WALT, J.P.; SCOTT, D.B. The yeast genus *Sacchacomycopsis* schiönning. **Mycophatology and Mycology Applied**, v. 43, n. 3-4, p. 279-288, 1971.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z., Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**. 2012

XU, J.; Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analyses. **Current Issues Molecular Biology**. v.8, n. 2, p.75-90, 2006.

ZANOL, G.C.; BALEIRAS-COUTO, M.M.; DUARTE, F.L. Restriction Profiles of 26S rDNA as a Molecular Approach for Wine Yeasts Identification, **Ciência Técnica Vitivinícola**, v. 25, n. 2, p.75-85, 2010.

ZIERDT, C. H.; DETLEFSON, C.; MULLER, J.; WAGGY, K.S. *Cyniclomyces guttulatus* (*Sacchacomycopsis guttulata*) – Culture, ultrastructure and physiology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 54, n. 4, p. 357-366, 1988.