

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE
Cyathostomum *guttulatus* (ROBIN, 1853) VAN DER WALT E SCOTT, 1971
E DE *Eimeria caviae* SHEATHER, 1924 PROCEDENTES DO
PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*Cavia porcellus* LINNAEUS, 1758)**

Gilberto Flausino

**Seropédica, RJ
2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA

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* LINNAEUS, 1758)

Gilberto Flausino

Sob a orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Coorientação

Dr. Walter Leira Teixeira Filho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Área de Concentração Sanidade Animal

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2013

636.089696

F587i

T

Flausino, Gilberto, 1957-

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*, Linnaeus, 1758) / Gilberto Flausino - 2013.

133 f. : il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 67-74.

1. Parasitologia veterinária - Teses.
2. Porquinho-da-índia - Doenças - Teses.
3. Porquinho-da-índia - Parasito - Teses.
4. Porquinho-da-índia como animal de laboratório - Teses. I. Lopes, Carlos Wilson Gomes, 1947-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

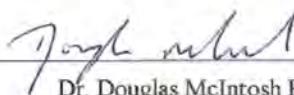
GILBERTO FLAUSINO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Área de concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM: 28/02/2013



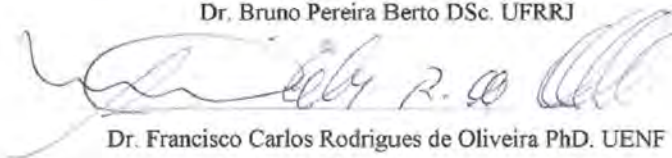
Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes PhD, LD. UFRRJ



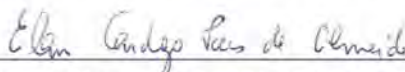
Dr. Douglas McIntosh PhD. UFRRJ



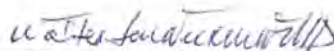
Dr. Bruno Pereira Berto DSc. UFRRJ



Dr. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira PhD. UENF



Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida DSc. UFF



Dr. Walter Leira Teixeira Filho PhD.UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que permitiu que aqui estivesse para mais uma etapa de provas e expiações. Depois, a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se realizasse, a saber:

Ao amigo e Prof. Dr. **Carlos Wilson Gomes Lopes**, pela orientação neste trabalho, pela amizade e pelo incentivo à continuidade nos estudos.

A todos, **Professores e Técnicos Administrativos**, do DMIV/IV, em especial ao Prof. Dr. **Marcelo Elias Fraga** os meus agradecimentos.

Aos Drs. **Walter Leira Teixeira Filho**, Co-orientador e **Walter Flausino** do Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) – Projeto Sanidade Animal (PSA) (Embrapa/UFRRJ), DPA/IV, pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. **Douglas McIntosh** e à Técnica de Laboratório **Tassia Torres Furtado**, do Laboratório de Biologia Molecular do CPGCV/IV IFES pela amizade e apoio técnico.

Agradecimentos, ainda, pela colaboração de todos os **colegas** do LCC–PSA, bem como a todos os colegas do CPGCV com os quais convivi neste período.

Agradeço aos **demais Professores** do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e **Colegas** de trabalho do Departamento de Parasitologia Animal/IV.

Agradecimentos a todos do **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-RJ/Colégio Nilo Peçanha, Pinheiral**, RJ pelo apoio no início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Bruno Pereira Berto** do DBA/IB desta IFES pela amizade e apoio técnico.

A esta **IFES**, da qual faço parte, a **seus servidores e, a todos** que, de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, os meus sinceros agradecimentos.

A todos, o meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

Gilberto Flausino filho de João Flausino e de Olívia Silvestre da Silva Flausino, nasceu em 8 de dezembro de 1957. Iniciou seus estudos no ano de 1964, quando ingressou na Escola Estadual Presidente Dutra, onde estudou do Jardim de Infância à 5ª série do antigo Curso Primário. Em 1970, iniciou o antigo Curso Ginásial no Ginásio Batista de Seropédica, vindo a concluí-lo no Colégio Fernando Costa, em 1973. De 1974 a 1976, cursou o 2º grau no Colégio Técnico (CTUR) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), formando-se em técnico em Agropecuária. Em 1977, ingressou no curso de graduação em Zootecnia da UFRRJ, concluindo-o em 1980. No ano de 1981 ingressou na Empresa Cargill Agrícola S/A, Departamento de Rações, onde trabalhou até 1990. Em 1991 retornou a UFRRJ, como bolsista de aperfeiçoamento à pesquisa do CNPq, no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária (IV). Em janeiro de 1994, após concurso público, ingressou no quadro Técnico Administrativo da UFRRJ, vindo a trabalhar no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, IV. Ainda, nesta IFES concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária, em 1999. Em março de 2005, concluiu Mestrado em Microbiologia Veterinária com a dissertação sobre “Isolamento de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt & Scott (1971) no Brasil: estudo de meios para obtenção e manutenção”. No ano de 2009 ingressou no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias desta mesma IFES.

“Fé inabalável só o é a que pode encarar frente a frente à razão, em todas as épocas da Humanidade”

Hippolyte Léon Denizard Rivail, 1804-1869

LISTA DE TABELAS

	Págs.
Tabela 1. Comparações do perfil molecular de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> com outras leveduras em pares de base (pb)	25
Tabela 2. Polimorfismo dos oocistos esporulados de <i>Eimeria caviae</i> procedentes de <i>Cavia porcellus</i> de uma criação rústica localizada em Seropédica, RJ	47
Tabela 3. Comparação das características morfométricas dos oocistos esporulados de <i>Eimeria caviae</i> isolados de <i>Cavia porcellus</i>	48
Tabela 4. Variação dos períodos de eliminação de <i>Eimeria caviae</i> de cobaios	53
Tabela 5. Desenvolvimento ponderal de cobaios de criação rústica desafiados com 10^6 oocistos esporulados de <i>Eimeria caviae</i> por via oral	57
Tabela 6. Aspectos comparativos das formas livres de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> e <i>Eimeria caviae</i> proveniente do intestino grosso de um porquinho-da-índia	63

LISTA DE FIGURAS

- Págs.
- Figura 1.** Morfologia dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* procedentes de *Cavia porcellus* de criações rústicas. Células (a) em sedimento procedentes de fezes frescas de cobaio. Azul de Algodão. Obj. 40X.; Pseudohifas com células vegetativas (b) em caldo YPG. Azul de Algodão. Obj. 40X.; Colônias (c) em crescimento (círculos) em placa de Petri, 5X; Colônia individual onde se observa bordos em crescimento (d). Meio YPG, 10X..... 24
- Figura 2.** Gel de agarose (1,5%) de electroforese de um fragmento com aproximadamente de 600 pares de bases (gerado por amplificação por PCR com base na região variável D1-D2 do gene codificador do rRNA 26S), a partir de um painel de espécies de leveduras. (1) *C. guttulatus* isolado de Cão, (2) de *C. guttulatus* isolado Coelho, (3) *Kazachstania* sp. isolado de cobaio, (4) *Cyniclomyces guttulatus* isolado de cobaio, (5) *Saccharomyces cerevisiae*, (6) *Candida albanata*, (7) *C. parapsilosis*, (8) *C. albicans*, (M) Marcador = 100 bp ADN. A posição da banda de 600 pb é mostrada com uma seta 26
- Figura 3.** . Padrões de bandas de restrição gerados a partir da digestão de amplicons D1-D2 usando uma enzima *MspI*. (1) Sem digestão, (2) *Candida albicans*, (3) *C. parapsilosis*, (4) *C. albanata*, (M) marcador de 50 pb (5), *Saccharomyces cerevisiae*, (6) *Cyniclomyces guttulatus* (cobaio), (7) *Kazachstania* sp. (cobaio) (8) *C. guttulatus* (coelho) e (9) *C. guttulatus* (Cão). Gel de Acrilamida a (12%). As posições dos marcadores representativos são mostradas ao lado direito da figura 27

- Figura 4** Padrões de bandas geradas a partir de digestão com enzima de restrição a partir de amplicons D1-D2 de oito colônias de *Cyniclomyces guttulatus* (1-8) isoladas de Coelhos, usando uma enzima MspI. Gel de Acrilamida a (12%). As posições dos marcadores representativos são fornecidas no lado direito da figura. 28
- Figura 5.** Padrões de bandas geradas por digestão com enzimas de restrição a partir de D1-D2 amplicons de *Cyniclomyces guttulatus* isolados de coelho ou cobaio usando três enzimas de restrição (HaeIII, MspI e Ddel). (M) marcador de 50 pb, em gel de Acrilamida (12%). As posições dos marcadores representativos estão no lado direito da figura 30
- Figura 6.** Desenho esquemático de um oocisto esporulados do gênero *Eimeria*. Abreviações. **(A) oocisto:** diâmetros, maior (DM) e menor (dm); parede do oocisto dividida em duas camadas (PO), membras, externa rugosa (a) e lisa (b); Grânulo polar (GP); corpo refrátil (CR); núcleo (N). **(B) esporocisto:** diâmetros, maior (EM) e menor (em); corpos, de stieda (CS) e de substieda (CSS); resíduo do esporocisto (RE)**(B) esporocisto:** diâmetros, maior (EM) e menor (em); corpos, de stieda (CS) e de substieda (CSS); resíduo do esporocisto (RE). (BERTO et al., 2008_a, modificado)..... 41
- Figura 7.** Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria caviae*, recuperados a partir de porquinhos- da - Índia (*Cavia porcellus*): (a, b, d) sub-esférico, (c, d) elipsoidal, e (D, E, F) oocistos ovoidal. Os (d) três formas podem ser observadas no mesmo campo. Solução de açúcar Sheather. Escala: 10µm..... 45

Figura 8.	Desenho esquemático de um oocisto esporulado de <i>Eimeria caviae</i> . (A) ooocisto : diâmetros, maior (DM) e menor (dm); parede do oocisto dividida em duas camadas (PO), membranas, externa rugosa (a) e lisa (b); Grânulo polar (GP); corpo refrátil (CR); núcleo (N). (B) esporocisto : diâmetros, maior (EM) e menor (em); corpos, de stieda (CS) e de substieda (CSS); resíduo do esporocisto (RE)	46
Figura 9.	Histogramas de (a) DM e dm, IM (b) e R ² (c) dos oocistos de <i>Eimeria caviae</i> procedente de Cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) de criação rústica.	51
Figura 10.	Percentual de oocistos esporulados por tamanho. (1) pequenos (2) médios e (3) grandes	52
Figura 11.	Eliminação média de oocistos <i>Eimeria caviae</i> por grama de fezes (OoPG) por <i>Cavia porcellus</i> infectados com 10 ⁶ oocistos esporulados/ml	54
Figura 12.	Taxa de esporulação de oocistos de <i>Eimeria caviae</i> eliminados por <i>Cavia porcellus</i> infectado experimentalmente com 10 ⁶ oocistos esporulados <i>per os</i> , correspondente aos respectivos dias de eliminação	55
Figura 13.	Determinação do limite de detecção do ensaio de PCR concebidos para a sequência de amplificação ITS-1 de <i>Eimeria caviae</i> . Coluna 1 = (7 ng de DNA), coluna 2 = (700 pg de DNA), coluna 3 = (70 pg de DNA), coluna 4 = (7 pg de DNA), coluna 5 = (700 fg do DNA), coluna 6 = (70 fg de DNA) coluna 7 = (7 fg de DNA). (M) marcador de 100 pb. Gel de agarose a um (1,5%). As posições dos marcadores representativos estão no lado direito desta figura	58

Figura 14. Aspectos comparativos entre as formas intestinais de *Cyniclomyces guttulatus*. Celulas vegetativas grandes (a) e pequenas (b) Giemsa.; (c) e (d) respectivamente. Ziel-Nielsen. *Eimeria caviae*. Macromerozoitas (e) e micromerozoítas (f) Gimsa; (g) e (h). respectivamente. Ziel-Nielsen. 1000X..... 64

LISTA DE ANEXOS

	Págs
Anexo 1. 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 <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in Dogs in Brazil. <i>Current Microbiology</i> , v. 65, n. 5, p. 542–546, 2012. [DOI: 10.1007/s00284-012-0184-6]	75
Anexo 2. FLAUSINO, G.; BERTO, B.P.; MCINTOSH, D.; FURTADO, T.T.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Phenotypic and genotypic characterization of <i>Eimeria caviae</i> from guinea pigs. <i>Acta Protozoologica</i> , 2013	81
Anexo 3. FURTADO, T.T.; FLAUSINO, G.; LEAL, P.D.S.; FERREIRA, J.P.; McINTOSH, D.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES C.W.G. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em cães – Relato de caso. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> , 35(1): 00-00, 2013	98

RESUMO

FLAUSINO, Gilberto. **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*, Linnaeus, 1758).** 2013. 113p. Tese (Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

De quatro criações de porquinhos-da-índia, localizadas no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram coletadas amostras de fezes de 15 animais de maneira aleatória onde seis (46,6%) deles foram positivos para *Cyniclomyces guttulatus*. Dessas colônias, somente em uma estavam presentes oocistos não esporulados de *Eimeria caviae* nas fezes de um animal. Os seis animais positivos para *C. guttulatus* foram eutanasiados para proceder ao isolamento de formas vegetativas deste ascomiceto. Da mesma forma, um único animal positivo para *C. guttulatus* e infectado por via oral com 10^6 oocistos esporulados foi também eutanasiado em câmara de CO₂ para servir de doador das formas endógenas tanto de *C. guttulatus* como de *E. caviae* encontradas nos raspados de mucosa do ceco e intestino grosso corados pelas técnicas de Giemsa e Ziehl-Nielsen. O projeto foi submetido à comissão de ética da UFRRJ sob o número 009759. *Cyniclomyces guttulatus* pode ser encontrado no trato digestório e nas fezes de *C. porcellus* como participante de sua microbiota sem causar lesões dignas de nota. Os isolados de *C. guttulatus* de cobaios possuem características fenotípica e genotípica idênticas aos isolados desta espécie encontrados em coelhos. A cepa de *E. caviae* isolada de cobaios de criações rústicas tem como morfotipos três tipos de oocistos esporulados, pequenos, medindo em média (18,07 x 16,39 µm), médios, medindo em média (20,87 x 17,87µm) e grandes, medindo em média (22,80 x 17,92µm), onde o polimorfismo pode ser observado através dos intervalos de classes nos histogramas e de sua regressão linear. Apesar dos valores, de diâmetro maior, serem significativos à morfologia dos oocistos esporulados não foi

diferente. Os períodos pré-patente e patente foram de cinco e sete dias, respectivamente, caracterizando a espécie como de período curto. Em infecção experimental, na dose de 10^6 oocistos esporulados de *E. caviae* não causou eimeriose, pois não houve desenvolvimento de sinais clínicos nos animais. As formas endógenas de *C. guttulatus* e de *E. caviae*, caracterizadas como células vegetativas e merozoítos respectivamente, foram as que devem ser analisadas criteriosamente para que não haja equívoco no diagnóstico diferencial entre os dois agentes etiológicos em um mesmo hospedeiro vertebrado. As características genóticas, tanto de *C. guttulatus*, quanto de *E. caviae* encontradas em *Cavia procellus* no Brasil foram determinadas e depositadas no GenBank

Palavras-chave: Caracterização fenotípica e genotípica, *Cyniclomyces guttulatus*, *Eimeria caviae*, porquinho-da-índia.

ABSTRACT

FLAUSINO, Gilberto. **Phenotypic and genotypic identifications of *Cyniclomyces guttulatus* (ROBIN, 1853) VAN DER WALT and SCOTT, 1971 and *Eimeria caviae* SHEATHER, 1924 isolates coming from the guinea pig (*Cavia porcellus* LINNAEUS, 1758). 2013. 113p.** Thesis (Veterinary Science). Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

Four creations of guinea pigs from rustic breeders located at the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil, stool samples from 15 animals were collected randomly, where six (46.6%) of them were positive for *Cyniclomyces guttulatus*. From the same creations, only one was found positive for unsporulated oocysts of *Eimeria caviae*. Six animals positive for *C. guttulatus* were posted to isolate vegetative forms of this acomycete. Likewise a single animal positive for *C. guttulatus* and infected orally as 10^6 sporulated oocysts of *E. caviae* was also euthanized with CO₂ in chamber to serve as a donor of both forms of endogenous phases of *C. guttulatus* as well as *E. caviae* found in scrapings of the cecum and colon mucosa. Smears were stained with Giemsa and Ziehl-Nielsen. The project was submitted from ethics committee of UFRRJ the number getting was 009759. *Cyniclomyces guttulatus* can be found in the digestive tract and feces of *C. porcellus* as a participant in their microbiota without causing notable injuries. Isolates of *C. guttulatus* of guinea pigs have phenotypic and genotypic characteristics identical to strains of this species found in rabbits. The strain of *E. caviae* also isolated from guinea pigs of rustic breedings had similar morphotypes, in spite of has three types of oocysts, small, measuring (18.07 x 16.39 µm), medium, measuring (20.87 x 17.87 µm) and large size, measuring (22.80 x 17.92 µm). Polymorphism among sporulated oocysts can be observed on the histogram class and its regression line. Although the values of DM are significant, the morphology of the sporulated oocysts was not different. The pre-patent and patent were five and seven days, respectively, characterizing the species as the short period. In experimental

infection at a dose of 10^6 sporulated oocysts of *E. Caviae*, eimeriosis was not observed, because there was no development of clinical signs in animals. The shapes of endogenous *C. guttulatus* and *E. caviae*, characterized as vegetative cells and merozoites respectively, were to be examined carefully to avoid any confusion in the differential diagnosis between the two etiological agents in the same vertebrate host. The genotypic characteristics of both, *C. Guttulatus* and *E. caviae* from *Cavia procellus* in Brazil were determined and deposited in GenBank.

Keywords: Phenotypic and genotypic characterizations, *Cyniclomyces guttulatus*, *Eimeria caviae*, Guinea pig.

SUMÁRIO

	Págs
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. O COBAIO OU PORQUINHO-DA-ÍNDIA	3
2.1.1. Um breve histórico	3
2.1.2. Adequação como animal de laboratório	4
2.1.3. Classificação zoológica	4
2.1.4. Biologia	5
2.1.5. Doenças mais comuns que afetam os cobaios	6
2.1.5.1. Não infecciosas	6
2.1.5.1.1. Maloclusão dos dentes pré-molares	6
2.1.5.1.2. Deficiência em vitamina C ou escorbuto	7
2.1.5.1.3. Alopecia	7
2.1.5.1.4. Estresse por Calor (Insolação ou Intermação)	8
2.1.5.1.5. Calcificação de tecidos moles	8
2.1.5.1.6. Neoplasia	8
2.1.5.1.7. Toxemia gravídica e intoxicação por antibióticos	9
2.1.5.2. Doenças infecciosas bacterianas	9
2.1.5.2.1. Linfadenite Cervical Enzoótica "Lumps".....	9
2.1.5.2.2. Pneumonia	9
2.1.5.2.3. Salmonelose	10
2.1.5.2.4. Outras bacterioses	10
2.1.5.3. Doenças infecciosas fúngicas	11
2.1.5.4. Doenças causadas por ectoparasitos	11
2.1.5.4.1. Pediculose	11
2.1.5.4.2. Infestação por ácaros	12
2.1.5.5. Doenças causadas por endoparasitos	12

	Págs
2.1.5.5.1. Parasitos intestinais	12
2.1.5.5.2. Parasitos teciduais	13
2.1.5.6. Doenças causadas por vírus	13
3. PARTE 1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (ROBIN, 1853) VAN DER WALT E SCOTT, 1971 DE INFECCÃO NATURAL DE COBAIOS (<i>Cavia porcellus</i>, LINNAEUS,1758)	15
3.1. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1.1. Classificação	15
3.1.2. Morfofisiologia	16
3.1.3. Genotipagem	17
3.1.4. Aspectos biológicos	17
3.1.5. Patogenicidade	18
3.1.6. Epidemiologiae Diagnóstico Diferencial	18
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.2.1. Descrição da Técnica de isolamento	20
3.2.2. Isolamento do DNA	21
3.2.3. Descrição da técnica	22
3.2.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA	22
3.2.5. Fomicrografias	23
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.3.1. <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	23
3.3.1.1. Identificações, fenotípica de isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> procedentes de cobaios	23
3.3.1.2. Análise genotípica	24
3.3.1.2.1. Análise molecular de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	24
3.3.1.2.2. Análise por sequenciamento	30
4. Parte 2. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE <i>Eimeria caviae</i> SHEATHER, 1924 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) E SUA INFECCÃO EXPERIMENTAL EM COBAIOS (<i>Cavia porcellus</i>)	32
4.1. REVISÃO DE LITERATURA	32
4.1.1. Classificação	32
4.1.2. Tipo morfológico	32

	Págs
4.1.3. Biologia	34
4.1.4. Clínica e Patologia	35
4.1.5. Epidemiologia e diagnóstico	36
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.2.1. Local de coleta e procedência das amostras	37
4.2.1.1. Amostras de <i>Eimeria caviae</i>	37
4.2.1.2. Infecção experimental de porquinhos-da-índia com <i>Eimeria caviae</i>	38
4.2.2. Análise laboratorial	39
4.2.2.1. Exame das fezes	39
4.2.2.2. Esporulação dos oocistos	39
4.2.2.3. Visualização dos oocistos	40
4.2.2.4. Mensuração dos oocistos	40
4.2.2.5. Desenhos e fotomicrografias dos oocistos	41
4.2.2.6. Identificação dos oocistos esporulados de <i>Eimeria caviae</i> por suas características morfológicas	41
4.2.3. Diagnóstico e identificação molecular	42
4.2.3.1. Extração do DNA e Identificação por PCR do isolado de <i>Eimeria caviae</i> procedente de <i>Cavia porcellus</i>	42
4.2.3.2. Identificação das amostras por sequenciamento do DNA de <i>Eimeria caviae</i> procedente de <i>Cavia porcellus</i> de uma criação rústica .	43
4.2.4. Análises morfométricas	44
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.3.1. <i>Eimeria caviae</i>	44
4.3.2. Identificação fenotípica dos oocistos esporulados	44
4.3.2.1. Morfologia	44
4.3.2.2. <i>Polimorfismo dos oocistos esporulados de Eimeria caviae</i>	44
4.3.3. Biologia	52
4.3.3.1. Eliminação de oocistos	52
4.3.3.2. Tempo de esporulação	54
4.3.4. Sintomas clínicos	55

4.3.5. Isolamento, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do DNA	56
5. PARTE 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE AS FORMAS ENDÓGENAS DE <i>Cyniclomyces guttulatus</i> E <i>Eimeria caviae</i> PROCEDENTES DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA (<i>Cavia porcellus</i>)	59
5.1. REVISÃO DE LITERATURA	59
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	59
5.2.1. Animais utilizados no experimento	59
5.2.2. Infecção dos animais	60
5.2.3. Necrópsia dos animais	60
5.2.4. Análise laboratorial	61
5.2.4.1. Raspado de mucosa	61
5.2.4.2. Fotomicrografias	61
5.2.4.3. Análise estatística	61
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.3.1. Aspectos comparativos das fases gastrintestinais de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> e <i>Eimeria caviae</i>	61
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	65
7. CONCLUSÕES	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

Durante a convivência com humanos os animais foram selecionados para várias atividades inerentes ao cotidiano. Desta maneira foram divididos de acordo com as suas afinidades. Sendo assim podem-se observar animais considerados como de produção, vindo a fornecer alimento na forma de leite e carne; para tração e, em alguns casos, utilizados como montaria.

Mais além, iniciou-se a aproximação entre algumas espécies de vertebrados que, dado a sua afinidade tão próxima com humanos, foram considerados como animais de companhia. Entre estes animais, alguns exóticos, não se levou em consideração o porte e sim a sua interação afetiva entre uma espécie e outra, dando-se assim uma maior abrangência aos considerados como animais de companhia, além do cão e o gato.

Neste grupo foi acrescido o cobaio, também conhecido como porquinho-da-índia. Este roedor, da espécie *Cavia porcellus* que, inicialmente, participava da cadeia alimentar dos povos andinos, entre eles os Incas, foi introduzido como animal de criação, primeiramente dos povos colonizadores e, posteriormente, difundido como animal de companhia e, mais tarde, como animal de laboratório.

A partir da convivência com humanos, seja na forma de mascote ou como animal de laboratório, passou-se a ter mais cuidado com as enfermidades nesta espécie, tanto com as zoonóticas quanto aquelas que são consideradas como fatores limitantes em sua criação. Sendo assim, verifica-se que em sua microbiota intestinal existe uma grande variedade de espécies que podem ser patogênicas ou não, entre elas algumas que, apesar de serem classificadas em reinos diferentes, podem ter fases de seu desenvolvimento com morfologia semelhante. Entre essas, pode-se destacar um ascomiceto, *Cyniclomyces guttulatus* e um coccídio, *Eimeria caviae*, ambos observados com certa frequência no sistema digestório de *C. porcellus*.

Os objetivos desta pesquisa tiveram como atividades gerais determinar as características, fenotípica e genotípica de formas de um ascomiceto semelhante ao descrito

para *C. guttulatus*, isolado de cobaios e determinar as características fenotípicas e genotípicas de *E. caviae* e, como atividades específicas, verificar a presença ou não desta levedura no trato gastrointestinal de cobaios; Verificar a patogenicidade ou não desta levedura para animais em condições naturais e comparar as fases de desenvolvimento gastrintestinais com as fases de desenvolvimento de *E. caviae* procedentes de criações rústicas, traçando um diagnóstico diferencial entre as mesmas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O COBAIO OU PORQUINHO-DA-ÍNDIA

2.1.1. Um breve histórico

De acordo com Andrade et al. (2002), o porquinho-da-Índia, também conhecido como cobaio ou *cuí*, apesar do nome, não tem origem na Índia e sim nos Andes, mais exatamente no Peru.

No século XVII, quando os espanhóis desembarcaram na América, mais precisamente no Peru, acreditavam ter chegado às Índias. Encontraram então os Incas, povo nativo da região, que criavam um animal chamado por eles de *cuí*, nome este dado devido ao som que emitiam. Criavam esse animal tanto como de estimação quanto para consumo e também os utilizavam em seus rituais, como oferenda aos deuses. Devido ao som que emitia semelhante ao de um suíno, chamaram-no de Porquinho-da-Índia. A partir daí, levaram-no para Europa, onde se difundiu rapidamente como animal de estimação (ANDRADE et al., 2002; WIKIPÉDIA, 2012).

Quanto ao nome em inglês, “*guinea pig*”, há duas hipóteses como explicação: a primeira é a de que o nome foi dado devido a uma controvérsia na qual o povo britânico pensava que seus navegadores, ao passarem na costa da Guiné, onde faziam escala, capturavam ou compravam esses animais e os levavam para a Grã-Bretanha. A segunda é a de que foi dado devido ao preço que os marinheiros britânicos cobravam por eles, um *guinéu*, moeda de ouro na época, ao desembarcarem (WIKIPÉDIA, 2012).

No Brasil foi introduzido pelos portugueses à época do descobrimento. Hoje é largamente distribuído no mundo e, além disso, são apreciados como iguaria principalmente na culinária dos países andinos (ANDRADE et al., 2002; WIKIPÉDIA, 2012).

2.1.2. Adequação como animal de laboratório

O pioneirismo de sua utilização na pesquisa científica deve-se a Lavoisier em 1790, ao realizar experimentos envolvendo o calor (ANDRADE et al., 2012).

Nuttal e Thierfelder em 1896 tentaram, pela primeira vez, obter animais gnotobióticos por cesariana, mantendo-os num ambiente isolado, sem germes, por um curto período de tempo. Entretanto, coube a Reyniers em 1946, o sucesso da obtenção desses animais livres de germes, utilizando para isso método apropriado de isolamento (ANDRADE et al., 2002).

Atualmente, existem várias raças e linhagens que são comercializadas como animais de companhia e para serem usados na pesquisa científica (WIKIPÉDIA, 2012).

Na indústria farmacêutica e nas pesquisas envolvendo a medicina, tanto humana quanto veterinária, ainda é largamente utilizado, tanto no teste de eficácia de drogas, quanto no diagnóstico de doenças (CCAC, 2005).

No Canadá, segundo dados do ano de 2005 do Canadian Council on Animal Care (CCAC), 28.659 cobaias foram utilizadas em experimentos só no ano de 2002, correspondendo a 1,4 % do total de animais utilizados em pesquisas nesse país. No Brasil, o Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), um dos maiores do país, forneceu para pesquisas 3.665 cobaias só no ano de 2004, o que torna o controle sanitário dos biotérios onde são criados, importante na obtenção de animais saudáveis e de qualidade para o uso em ensaios biológicos. Apesar da importância, são escassos os trabalhos sobre a prevalência e intensidade de infecção da fauna parasitária em cobaias provenientes de biotérios (ALVES et al., 2007).

2.1.3. Classificação zoológica

A classificação zoológica desta espécie foi determinada com base em Woods e Kilpatrick (2005) e Wikipédia (2012).

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Filo: Chordata Bateson, 1885

Classe: Mammalia Linnaeus, 1758

Ordem: Rodentia Bowdich, 1821

Família: Caviidae Fischer von Waldheim, 1817

Sub-família: Caviinae Pallas, 1766

Gênero: *Cavia* Pallas, 1766

Espécies: *Cavia porcellus* Linnaeus, 1758

Várias outras espécies deste gênero são encontradas na América do Sul, inclusive algumas delas no Brasil. Essas espécies são: *Cavia Tschudii* Fitzinger, 1857; *Cavia guianae* Thomas, 1901; *Cavia anolaimae* Allen, 1916; *Cavia aperea* Erxleben, 1777 ; *Cavia nana* Thomas, 1917; *Cavia fulgida* Wagler, 1831; *Cavia magna* Ximenez, 1980 e *Cavia intermedia* Cherem, Olimpio & Ximenez, 1999 (WIKIPÉDIA, 2012; WOODS; KILPATRICK,2005).

2.1.4. Biologia

O cobaio possui várias raças, entre elas a Bicolor, Short hair, Sheltie, Coronet, Angorá, Roseta, US-Teddy, Rex, Merino e Texel. É utilizado nas áreas de pesquisa em saúde pública, na indústria de cosméticos ou comercializados como animal de estimação, *pets* ou mascotes. Na pesquisa, de um modo geral, é utilizada a linhagem albina de pelo curto. Nasce pesando em média 100g. Vive de quatro a oito anos, atingindo a maturidade sexual a partir dos três meses, reproduzindo-se durante todo o ano, gerando dois a cinco filhotes por ninhada. Seu ciclo estral dura 16 dias, mas pode variar de 13 a 20 dias, período de gestação é de 59 a 72 dias, sendo a média de 62 dias. O tamanho dos filhotes, ao nascer, é de 7,62 cm. A idade ideal para o desmame é de três semanas. Quando adulto, o macho mede cerca de 30 cm e pesa de 0,9 a 1,2 Kg, enquanto a fêmea costuma ser menor e mais leve, tendo em média 20 cm e pesando de 700 a 900 gramas (ANDRADE et al., 2002; WIKIPÉDIA, 2012).

São vivazes e dóceis, raramente nos mordem, a menos que se sintam ameaçados. Adaptam-se bem ao cativeiro e são alimentados com ração de coelho peletizada, quando não se tem a ração própria por ter baixa produção pelas indústrias de misturas balanceadas, o feno ou capim, legumes, hortaliças (exceto alface, que pode causar-lhe diarreia) e frutas frescas. Dentre as hortaliças recomenda-se a introdução do brócolis e da couve-flor na sua alimentação, por causa da quantidade de vitamina C que oferecem. Alimentos novos para o animal devem ser oferecidos aos poucos, um de cada vez, observando-se sempre a reação do mesmo (WILLIAMS, 1976; ANDRADE et al., 2002; WIKIPÉDIA, 2012).

Muito rústico este animal adapta-se facilmente a qualquer ambiente, exigindo apenas um local bem seco e que receba luz do sol direta durante uma boa parte do dia. Não requer quaisquer instalações especiais ou técnicas difíceis de manutenção. Basta um espaço onde possa organizar a sua rotina diária composta de passeios e brincadeiras além da higiene própria. Alguns criadores recomendam, para um casal, um espaço em torno de 0,32 m², sem teto e com uma vedação baixa. Para melhorar o conforto pode ser disponibilizado um pequeno abrigo para que possam resguardar-se do frio. Tenha sempre em atenção a exposição perigosa a eventuais predadores como gatos, cães e ratos (WIKIPÉDIA, 2012).

2.1.5. Doenças mais comuns que afetam os cobaios

O cobaio é acometido por diversas patologias tanto de origem não infecciosa quanto infecciosa. As infecciosas são causadas principalmente por bactérias, vírus, fungos e protozoários. Segue abaixo a descrição breve de algumas delas:

2.1.5.1. Não infecciosas

2.1.5.1.1. Maloclusão dos dentes pré-molares

Ocorre com frequência em cobaios idosos, com idade acima de três anos. Os dentes superiores e inferiores reúnem-se indevidamente durante a mastigação, vindo a desgastarem desuniformemente com o tempo. Isto causa aprisionamento e lesão contínua à língua, prejudicando a mastigação, a ingestão de alimentos e promovendo a “babeira”, devido a não retenção da saliva. Sua característica é a presença contínua de umidade ao redor da boca, região mentoniana e região ventral do pescoço. Pode levar o animal à morte por inanição. Por ser um problema hereditário, recomenda-se que animais com este problema não sejam

criados, para não transmitirem essa característica aos seus descendentes (ANDRADE et al., 2002).

Segundo Carvalheira et al. (2012), na clínica de roedores a maloclusão é a mais frequente afecção encontrada, podendo resultar de fatores genéticos, dietéticos, infecciosos ou traumáticos. Nos caviomorfos os dentes incisivos, pré-molares e molares apresentam crescimento contínuo, sendo que os molares e pré-molares maxilares apresentam crescimento lateralmente em direção às bochechas, enquanto os mandibulares crescem medialmente em direção à língua, podendo causar a oclusão da orofaringe.

2.1.5.1.2. Deficiência em vitamina C ou escorbuto

Cobaios não sintetizam vitamina C, portanto, devem receber um suprimento adequado desta vitamina a partir de fontes sintéticas ou alimentos ricos nesta. Seu efeito maior está relacionado com a síntese do colágeno, na qual o ácido ascórbico é essencial. Sua deficiência resulta em escorbuto, que é caracterizada por inapetência, hiporexia, diarreia, secreção nasal e ocular, baixo desempenho reprodutivo, inchaço, dor nas articulações e costelas, relutância em se movimentar, ossos fracos, mau desenvolvimento dos dentes e sangramento espontâneo na gengiva e nos músculos. Fórmulas de misturas balanceadas devem ser feitas acrescidas de vitamina C, levando-se em consideração as perdas no processo de peletização. Cuidados no manuseio e armazenamento adequado, evitando exposição à luz, calor e a umidade do alimento peletizado, pois, evita perda maior desta vitamina. Por segurança, os porquinhos-da-índia devem receber suplementação de vitamina C, além da ração, para evitar o aparecimento dos sinais clínicos do escorbuto (RIGBY, 1976; ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.1.3. Alopecia

É um problema comum nas fêmeas reprodutoras quando há gestações sucessivas, sem intervalo entre partos. Isso as leva a perder pêlos a cada gestação. O stress da experimentação e o vício (mau hábito), onde os animais habitualmente mastigam a pelagem de outros que estão em um nível mais baixo na hierarquia social, são outras causas que podem levar à queda de pêlos. Os animais jovens são as mais frequentes vítimas desse vício. Esse problema também é notado entre os animais juvenis fracos, ao desmame. Os machos são raramente afetados (ANDRADE et al., 2002).

Doenças fúngicas e infestações por ectoparasitos são também fatores predisponentes para a queda de pêlos nestes animais.

2.1.5.1.4. Estresse por Calor (Insolação ou Intermação)

Os cobaios, principalmente os acima do peso e/ou com muitos pêlos, são extremamente sensíveis ao calor. Temperaturas ambientais acima de 32°C, alta umidade (acima de 70%), sombra inadequada e superlotação, ventilação e estresse são fatores adicionais predisponentes. Sinais de excesso de calor incluem respiração ofegante, salivação, fraqueza, paralisia dos membros posteriores, delírio, convulsões e, eventualmente, a morte. A insolação ou intermação é tratável quando detectada relativamente cedo. Animais estressados pelo calor devem ser imediatamente pulverizados ou banhados com água fria. A criação em ambiente com níveis de temperatura e umidade dentro dos limites ideais é recomendada (ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.1.5. Calcificação de tecidos moles

Pode ser causado pelo desequilíbrio na relação cálcio, fósforo, magnésio e potássio na dieta. Entretanto, há suspeitas de que a ingestão excessiva de vitamina D possa contribuir para a patologia. Achados de necrópsias de animais a partir de um ano de idade, geralmente, mostram a deposição de cálcio em órgãos como coração, fígado, rins e pulmões, características da doença (ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.1.6. Neoplasia

É uma doença rara em cobaios. Tal como acontece com a maioria dos animais, é mais susceptível de afetar animais idosos. A maioria dos tumores é benigna e envolvem a pele e mucosa do trato respiratório. O câncer também pode afetar o trato reprodutivo, glândulas mamárias e o sangue (leucemia) (PFLAUM, 2012).

2.1.5.1.7. Toxemia gravídica e intoxicação por antibióticos

A primeira ocorre, geralmente, em cobaias em estágio avançado de gestação. É caracterizada por acidose, cetose, degeneração gordurosa hepática, evoluindo para morte do animal. Dentre outros fatores que levam a essa síndrome metabólica pode-se destacar obesidade, jejum e carga fetal. Os sintomas aparecem 7-10 dias antes do parto, de forma aguda, caracterizada por perda de peso, pelagem áspera, prostração, dispnéia e morte (ANDRADE et al., 2002). A segunda ocorre por antibioticoterapia, quando se usa drogas antibacterianas com especificidade para bactérias GRAM positivas (predominantes), causando desequilíbrio na microbiota intestinal, permitindo a proliferação de bactérias GRAM negativas, levando à enterotoxemia (WILLIAMS, 1976).

2.1.5.2. Doenças infecciosas bacterianas

2.1.5.2.1. Linfadenite Cervical Enzoótica, *Lumps*

É uma zoonose que afeta, frequentemente, colônias de cobaias e tem como agente etiológico *Streptococcus zooepidemicus* Frost e Englebrecht, 1936. É caracterizada por abscessos que ocorrem nos linfonodos, logo abaixo da mandíbula, na parte superior do pescoço. Alimentos grosseiros, como o feno, por exemplo, podem ferir o revestimento da boca atingindo a pele ao longo dos gânglios linfáticos. Ocorre então uma infecção bacteriana formando dolorosos abscessos supurativos sob o maxilar inferior. Às vezes, esses abscessos rompem e exsudam um espesso, cremoso pus branco-amarelado. Antibiogramas deverão ser feitos para determinar o antibiótico adequado para uso. Pode evoluir para peritonite, necrose hepática focal, pericardite fibrinosa, otite média purulenta e pleuropneumonia. Pode ocorrer alta mortalidade em caso de septicemia (ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.2.2. Pneumonia

É uma das doenças bacterianas mais comuns em cobaias. Uma série de potenciais bactérias causadoras dessa doença habita o trato respiratório de cobaias normais. Estresse, dieta inadequada, e manejo deficiente são os principais fatores que predispõem os cobaias a essa infecção respiratória. Sintomas de pneumonia podem incluir respiração ofegante,

descargas de olhos e narinas, letargia e inapetência. Alguns animais não mostram sintomas antes de morrerem de repente. Otites de ouvido médio e interno, ocasionalmente, resultam em pneumonia em cobaias. Sintomas adicionais podem incluir incoordenação motora; inclinação da cabeça, com movimentos circulatórios e, animais rolando sobre o próprio eixo. Antibioticoterapia, após antibiograma, e cuidados de suporte adequado são necessários. Os agentes etiológicos mais comuns são *Bordetella bronchiseptica* (Ferry, 1912) Moreno-López, 1952 e *Diplococcus pneumoniae* (Klein, 1884) Weichselbaum, 1886 (= *Streptococcus pneumoniae* ou *Pneumococcus*) (ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.2.3. Salmonelose

Segundo Andrade et al. (2002), é causada, com maior frequência, pela *Salmonella typhimurium* (Loeffler, 1892) Castellani e Chalmers, 1919 e *Salmonella enteritidis* (Gaertner, 1888) Castellani e Chalmers, 1919. Por sua letalidade é uma doença de alto risco de transmissão tanto para o homem, pois, é uma zoonose, quanto para outros animais. As fontes de infecção são, geralmente, a água ou o alimento contaminado. Apresenta-se de forma aguda, subaguda, crônica ou latente. Possui alta letalidade (50-100%) e seus sintomas frequentes são pelagem áspera, anorexia, perda de peso, debilidade geral e conjuntivite. Fêmeas prenhes e animais jovens são os mais afetados. É uma doença de difícil controle que, quando instalada, requer a eliminação de todos os animais do plantel.

2.1.5.2.4. Outras bacterioses

Além dos agentes bacterianos citados acima, Andrade et al. (2002) relataram outros não menos importantes microorganismos, causadores de doenças, como *Yersinia pseudotuberculosis* (Pfeiffer, 1889) Smith e Thal, 1965 (Yersiniose ou Pseudotuberculose), *Clostridium piliforme* (Tyzzer, 1917) Duncan et al., 1993, (Doença de Tizzer), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900, que em condições insalubres pode causar brocopneumonia e septicemia aguda, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884, (Estafilococose), *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887, *Pasteurella multocida* (Lehmann e Neumann, 1899) Rosenbusch e Merchant, 1939, *Arcanobacterium pyogenes* (Glage, 1903) Pascual Ramos et al., 1997 (= *Corynebacterium pyogenes*),

Leptospira spp. Noguchi, 1917 (Leptospirose) e *Mycobacterium* spp. Lehmann e Neumann, 1896.

2.1.5.3. Doenças infecciosas fúngicas

Dentre as doenças fúngicas em cobaias destaca-se a dermatofitose, que é uma doença de pele causada por várias espécies de fungos dermatófitos. Os animais jovens geralmente são mais suscetíveis do que adultos. Micose em cobaias é geralmente caracterizada por perda de pêlo no rosto, nariz e orelhas. Áreas de alopecia podem se estender ao longo da parte superior do tronco (ANDRADE et al., 2002).

Surtos de micose envolvendo *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) Sabour, 1895 e *Microsporum canis* Bodin, 1902 são comuns em colônias de cobaias. Estas dermatomicoses são extremamente importantes porque são zoonoses (RIGBY, 1976). Motta e Paula (1974) isolaram *T. mentagrophytes* de vários exemplares de um grupo de 700 cobaias do biotério da Fundação Gonçalo Muniz, no estado da Bahia. Além disso, Kraemer et al. (2012) relataram que esta espécie foi a mais comum dentre os fungos dermatófitos encontrados em cobaias. Já Cavalcanti et al. (2002), num estudo experimental, ao infectar cobaias com *M. canis*, observaram ao exame histopatológico de biópsias cutâneas a presença de infiltrado neutrofílico e edema, associados à acantose, hiperkeratose e espongiose na epiderme.

A possibilidade da associação de um ou mais agentes etiológicos de origem micótica foi observada por Coutinho et al. (2001) ao isolar *T. mentagrophytes* e *Scopulariopsis brevicaulis* (Saccardo) Bainer, 1907 de cobaias mantidas em biotérios no Rio de Janeiro, RJ.

Encephalitozoon spp., antes considerado um protozoário, é outro fungo que causa doença em cobaias (RIGBY, 1976; ANDRADE et al., 2002).

2.1.5.4. Doenças causadas por ectoparasitos

2.1.5.4.1. Pediculose

Piolhos são insetos ectoparasitos mais comuns em cobaias. Duas espécies de piolhos malófagos podem parasitar esses animais. Ambos alimentam-se de fluídos resultantes das lesões causadas na superfície da pele, por suas agressões. Infestações leves normalmente passam despercebidas enquanto infestações pesadas são geralmente acompanhadas de prurido

excessivo, arranhões e alopecia. Podem ocorrer escaras em torno das orelhas. Deve-se evitar alta densidade populacional e adotar medidas de higiene para evitar a instalação da pediculose. Sua propagação ocorre de forma horizontal, a partir de animal infestado (ANDRADE et al., 2002).

Segundo Valim et al. (2004), das espécies de piolhos mastigadores mais comumente encontrados sobre o cobaio destacam-se *Gliricola porcelli* (Linnaeus, 1758); *Gyropus ovalis* (Nitzsch, 1818) e *Trimenopon hispidum* (Burmeister, 1838). Os piolhos do cobaio são denominados vulgarmente como piolho fino, correspondente à espécie *G. porcelli*, e piolho oval, *G. ovalis*.

A infestação de piolhos por *G. ovalis* e *G. porcelli* em cobaias, frequentemente, é conjunta. Normalmente, não causa desconforto nos animais parasitados, mesmo em infestações maciças. A espécie *Trimenopon jenningsi* (Kellogg e Paine, 1916) foi descrita em cobaios, mas hoje é raramente encontrada (RIGBY, 1976).

2.1.5.4.2. Infestação por ácaros

Ácaros são aracnídeos microscópicos que causam infestações severas nos cobaios, parasitando as camadas externas da pele, onde formam verdadeiras galerias. A alopecia e o prurido intenso são características marcantes que podem indicar sua presença nos animais. Ao se coçarem os animais podem sofrer lesões graves, abrindo portas para infecções secundárias e miíases (ANDRADE et al., 2002).

Várias espécies de ácaros parasitam cobaios. *Chirodiscoides caviae* (Hist, 1917) é uma delas, muito difundida nos EUA, principalmente em colônias comerciais. Infestação pelos ácaros, *Myocoptes musculinus* (Koch, 1844) de ratos, *Sarcoptes scabiei* (Degeer, 1778) de coelhos e de outros animais, e *Notoedres muris* Mégnin, 1877, de ratos, foram observados em cobaios. Em cada caso o surto origina do contato com animais infestados das respectivas espécies hospedeiras. A espécie *Demodex caviae* Bacilgalupo e Roveda, 1954, foi encontrada no tecido muscular conjuntivo de cobaias que sofriam de conjuntivite (RIGBY, 1976).

2.1.5.5. Doenças causadas por endoparasitos

2.1.5.5.1. Parasitos intestinais

Pouca importância é dada aos estudos sobre a prevalência e intensidade das parasitoses intestinais na criação de cobaios nos biotérios no Brasil (ALVES et al., 2007).

A coccidiose guarda uma especificidade com seu hospedeiro, que pode ser de várias classes. São parasitos intracelulares e causam sérios prejuízos econômicos em animais de produção, devido às lesões que causam no trato gastrointestinal, principalmente intestino delgado, onde interferem na absorção dos nutrientes (Síndrome da má absorção) (RIGBY, 1976). A coccidiose que acomete os cobaios é causada, até o presente momento, por uma só espécie, *Eimeria caviae* Sheather, 1924.

Problemas intestinais em cobaios podem estar associados à infecção por *E. caviae*. Seus principais sintomas são fraqueza, diarreia, e acentuada perda de peso. No entanto, segundo Williams (1976), *E. caviae* não é problema em criações de cobaios nas instituições de pesquisa pois, não é patogênica, mas pode ocorrer, ocasionalmente, sintomas como colite e diarreia, podendo levá-los à morte.

De acordo com Alves et al. (2007), já foi constatado que os parasitos do cobaio podem causar interferências nos resultados dos experimentos que utilizam esse modelo animal.

Além desse parasito foram encontrados *Balantidium* sp., *Cyathodium* sp., *Cryptosporidium* spp., os tissulares *Klosiella* spp. *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) Nicolle e Manceaux, 1909 e os helmintos da espécie *Paraspidodera uncinata* (Rudolphi, 1819) Travassos, 1914 (RIGBY, 1976; ANDRADE et al., 2002). Outros parasitos como *Giardia muris* Grassi, 1879 e os helmintos *Fasciola hepática* Linnaeus, 1758 e *F. gigantica* Cobbold, 1885 também foram assinalados. Além desses, vários outros parasitos foram citados por Schoeb (2012).

2.1.5.5.2. Parasitos teciduais

Andrade et al. (2002), citaram ainda como parasito sistêmico *Leishmania enrietti* (BRYCESON et al., 1970) e *Sarcocystis caviae* (ODENING, 1998) como parasito tecidual.

2.1.5.6. Doenças causadas por vírus

Segundo Andrade et al. (2002) e Schoeb (2012) , os vírus de maior importância em infecções naturais de cobaios são *Citomegalovirus* (CMV) ou vírus da glândula salivar, Herpevírus-*simile* de cobaias, vírus da Leucemia de cobaios e o vírus da Coriomeningite linfocítica.

Além destes agentes etiológicos responsáveis por infecções em cobaias, estas últimas poderão ser portadoras de outros agentes etiológicos passíveis de serem transmitidos para humanos como mascotes ou mesmo em atividades laboratoriais, alguns deles, ainda são considerados como comensais, não se sabendo ao certo a sua importância no trato gastrointestinal de cobaias, como, no caso do ascomiceto *C. guttulatus*, ao lado de *E. caviae*, coccídeo comumente observado em fezes de cobaio. Estes dois agentes etiológicos possuem, no hospedeiro em questão, formas que se assemelham, muitas vezes dando interpretações de caráter duvidoso quanto ao diagnóstico diferencial das duas infecções, principalmente na fase aguda da eimeriose. Sendo assim, este estudo foi separado em capítulos para melhor entendimento, a saber:

Parte 1. Identificação fenotípica e genotípica de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) Van Der Walt e Scott, 1971 isolado de infecções naturais em cobaias (*Cavia porcellus*) de criações rústicas;

Parte 2. Identificação fenotípica e genotípica de isolados de *Eimeria caviae* Sheather, 1924 (Apicomplexa: Eimeriidae) e sua infecção experimental em cobaias (*Cavia porcellus*) de criações rústicas e originários de biotério de referência.

Parte 3. Diagnóstico diferencial entre as formas gastrintestinais de *Cyniclomyces guttulatus* e *Eimeria caviae*

3. PARTE 1. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Cyniclomyces guttulatus* (ROBIN, 1853) VAN DER WALT E SCOTT, 1971 ISOLADO DE INFECÇÃO NATURAL EM COBAIOS, *Cavia porcellus*, LINNAEUS, 1756.

Entre as várias espécies de leveduriformes, pouca importância se dava ao fato da presença deste ascomiceto nas fezes de coelhos, onde Costa et al. (2001) aventaram a possibilidade das fases desta levedura assemelharem-se as fases de infecção de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977. Mais tarde, observou-se que esta levedura não só poderia ser encontrada em coelhos, mas também em outras espécies animais como afirmaram Flausino et al. (2012) ao observarem a presença desta espécie em cães do município do Rio de Janeiro, RJ.

3.1. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1. Classificação

De acordo com Kirk et al. (2008), este ascomiceto é um microrganismo que tem a seguinte classificação:

Império: Eukaryota Corliss, 1994

Reino: Fungi Jahn e Jahn, 1949

Filo: Ascomycota Bold, 1957

Classe: Saccharomycetes Winter, 1881

Ordem: Saccharomycetales Kudrjanzev, 1960

Família: Saccharomycetaceae Winter, 1881 (*incerta sedis*)

Gênero: *Cyniclomyces* Van Der Walt e Scott, 1971

Espécie: *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) Van Der Walt e Scott, 1971

Sinonímia: [(=*Cryptococcus guttulatus* Robin, 1853; *Saccharomycopsis guttulatus* (Robin, 1853) Schiønning (1903); *Atelosaccharomyces guttulatus* (Robin, 1853) de Beurmann e Gougerot (1909)].

De acordo com Phaff e Miller (1958), este ascomiceto foi observado pela primeira vez, *in situ*, por Remak em 1845 no trato digestório e nas fezes de coelhos e de roedores domésticos e silvestres. Sua classificação foi modificada por diversas vezes, chegando-se a atual denominação através de Van Der Walt e Scott, (1971).

Esta última alteração proposta teve como objetivo eliminar a confusão existente em sua classificação, inclusive eliminando a denominação de gênero *Endomycopsis*, usado durante muito tempo, mesmo contrariando o código de nomenclatura botânica, hoje Código Internacional de Nomenclatura. Então, Van Der Walt e Scott (1971) propuseram a criação de um novo gênero denominado *Cyniclomyces*, tendo como única espécie tipo *C. guttulatus*.

3.1.2. Morfofisiologia

As células de *C. guttulatus* são caracterizadas por apresentarem-se de forma cilíndrica alongada, isoladas, em duplas ou em cadeias curtas (SHIFRINE; PHAFF, 1958). Entretanto, Flausino et al. (2012) observaram longas cadeias formando pseudo- hifas em lavado estomacal de cães, fato até então não observado. Sua reprodução ocorre por brotamento bipolar em base larga. As células possuem as dimensões de 4,4 - 6,1 x 14 - 21µm em meio líquido (SHIFRINE; PHAFF, 1958) e de 4,7-7,9 x 8,8-19,5 µm em meio sólido (PHAFF; MILLER, 1971). Quando cultivadas em meio líquido formam pseudomicélio. Entretanto, hifas verdadeiras não são formadas. Podem ser vistas tanto em sua forma vegetativa, no estômago ou nas fezes, quanto ascosporada nas fezes (raramente), contendo nesta última de um a quatro ou até seis ascosporos ovais ou cilíndricos (PHAFF; MILLER, 1971; KURTZMAN; FELL, 1998). Tubos germinativos são formados com a perda simultânea da membrana externa do esporo.

Com relação a sua fisiologia são fermentadores de carboidratos, com crescimento condicionado a temperaturas entre 30°C e 40°C (BUECHER; PHAFF, 1972; KURTZMAN; FELL, 1998), sendo que Zierdt et al. (1988) verificaram um melhor crescimento entre 38°C e 42°C. São dependentes de altos teores de CO₂ (RICHLE; SCHOELER, 1961; BUECHER;

PHAFF, 1970; BUECHER; PHAFF, 1972; ZIERDT et al., 1988, KURTZMAN; FELL, 1998; FLAUSINO; BARONI, 2009). Em provas bioquímicas foram observadas a produção de urease e fraca fermentação de maltose e manitol (FLAUSINO; BARONI, 2009), ambas não observadas previamente (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958; RICHLE; SCHOLER, 1961). Ainda existe a exigência de aminoácidos e de vitaminas do complexo B (ZIERDT et al., 1988; KURTZMAN; FELL, 1998). Segundo Zierdt et al. (1988), o condicionamento do crescimento de *C. guttulatus* a baixos valores de pH e a diversidade de meios existentes refletem a dificuldade do cultivo.

3.1.3. Genotipagem

Até o presente momento, uma cepa encontrada em coelhos (KURTZMAN; ROBNET, 1998) e outra em cães (GJERDE et al., 2009) foram identificadas e seus sequenciamentos das regiões D1/D2 26S-RNA foram depositados no GENbank/ NIH, EUA, da mesma maneira que os isolados encontrados em coelhos e cães (FLAUSINO et al., 2012) no Brasil também foram depositados.

3.1.4. Aspectos biológicos

Cyniclomyces guttulatus, até então, é habitante natural do trato digestório de coelhos e roedores, como em porquinho-da-índia (ZIERDT et al., 1988) sejam eles, domésticos ou silvestres. Sua reprodução ocorre por brotamento bipolar em base larga e tanto os ascos quanto às células vegetativas têm parede com dupla membrana. Quando cultivadas em meio líquido formam pseudomicélio. Não formam hifas verdadeiras. Podem ser vista na sua forma vegetativa quando ascosporada (raramente), contendo nesta última de um a seis ascos ovais ou cilíndricos (PHAFF; MILLER, 1971; KURTZMAN; FELL, 1998; KURTZMAN; FELL, 1999). Cada asco pode conter, geralmente, de um a seis ascosporos. Os tubos germinativos são formados com a perda simultânea da membrana externa do esporo.

Apesar de ser considerado como um microrganismo de grande dificuldade de isolamento e manutenção (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958; SHIFRINE; PHAFF, 1959; RICHLE; SCHOLER, 1961; BUECHER; PHAFF, 1970; PHAFF; MILLER, 1971; BUECHER; PHAFF, 1972; ZIERDT et al., 1988), seu isolamento e manuseio foram desenvolvidos por Flausino (2005) no Brasil. Seus isolados podem ser mantidos por um

longo período através de sucessivas sementeiras em meio YPG e YPGA modificado (FLAUSINO; BARONI, 2009).

Segundo Shifrine e Phaff (1958), o ciclo biológico de *C. guttulatus* está relacionado à coprofagia e a eliminação de ascosporos nas fezes. Porém, Zierdt et al. (1988) relataram que, na ausência de coprofagia, provavelmente ocorra auto sustentação. Já, Buecher e Phaff (1972) pensaram na possibilidade da ocorrência de um quimiostato natural no estômago de coelho.

3.1.5. Patogenicidade

Apesar da controvérsia quanto a sua patogenicidade, este microrganismo já foi suspeito de ter causado diarreia crônica em coelhos (RICHLE; SCHOELER, 1961) e, atualmente na Europa é considerado como um dos agentes etiológicos associados a casos de diarreia em coelhos e chinchilas (ANONIMO, 2000). Da mesma maneira, também tem sido associado a casos de diarreia em cães (HOUWERS; BLANKENSTEIN, 2001; NEEL et al., 2006; GJERDE et al., 2009 e DIJKSTRA et al., 2010; SAITO et al. 2012) e em um gato (PETERS; HOUWERS, 2009). Apesar de *C. guttulatus* não ser incluído como habitante natural em carnívoros. Casos recentes foram observados em cães, no município do Rio de Janeiro, sendo que um deles com sintomas de gastroenterite hemorrágica (FLAUSINO et al., 2012).

3.1.6. Epidemiologia e Diagnóstico Diferencial

Conhecido há mais de 150 anos como habitante do trato intestinal de coelhos e, há 51 anos em roedores (RICHLE; SCHOLER, 1961), *C. guttulatus* está associado a áreas da superfície da mucosa estomacal de ratos, camundongos e de outros roedores, onde formam um revestimento interno extracelular (ZIERDT et al., 1988).

Outros animais colonizados por esta levedura incluem coelhos selvagens e chinchilas (RICHLE; SCHOLER, 1961; ZIERDT et al., 1988), os coelhos domésticos, porquinhos-da-índia (ZIERDT et al., 1988) e a lebre selvagem da Califórnia (*Lepus californicus* Gray, 1837). Saito et al. (1984) observaram *C. guttulatus* em cães no Japão. Howers e Blankenstein (2001) relataram que esta espécie foi observada em cães que tiveram diarreia, contrariando assim, a afirmativa prévia de Shifrine e Phaff (1958), que afirmaram que *C. guttulatus* não seria encontrado em carnívoros.

Até o presente, não são conhecidos benefícios, bem como, não são conhecidas as alterações associadas à presença deste leveduriforme (ZIERDT et al., 1988). Ainda, com base em Zierdt et al.(1988), uma camada destas leveduras forma uma barreira entre os conteúdos do lúmen estomacal e a superfície da mucosa. Com a alta taxa de reprodução, as leveduras são eliminadas nas fezes. Richle e Shoeler (1961) ao verificar a possibilidade desse ascomiceto estar associado à enterite em coelhos, não chegaram à conclusão sobre a real patogenicidade dessa levedura.

Howers e Blankeinstein (2001) relataram a observação desta levedura em 15% de amostras de fezes de cães que tiveram diarreia crônica, quando consultados no Centro de Diagnóstico Microbiológico Veterinário na Holanda. Estes autores pensaram que a explicação para a presença desta levedura no trato digestório dos cães devia-se a um processo de queda de resistência, permitindo sua infecção de forma secundária e sua colonização. Esses fatores facilitariam a instalação deste microrganismo ao atingirem o estômago e o intestino, após a ingestão de fezes de coelhos, já que muitos cães são coprófagos. Previamente, Peter e Howers (2009) já tinham observado esta levedura em grande quantidade nas fezes de um gato com diarreia. Entretanto, Flausino et al. (2012) observaram *C. guttulatus* em 34 (24,61%) de um total de 66 cães examinados em uma clínica veterinária no município do Rio de Janeiro, Brasil. Dos animais positivos, três tinham quadro clínico característico de gastroenterite e, de um deles, isolaram esta levedura.

Segundo Van Praag (2009) as células de *C. guttulatus* na sua fase gastrintestinal devem ser diagnosticadas com cuidado, pois podem ser confundidas com formas exógenas das espécies do gênero *Eimeria* de coelhos. Esta afirmativa foi também assinalada por Costa et al. (2001), em relação a formas endógenas, quando trabalharam com a infecção experimental de *C. felis* em coelhos domésticos.

Este ascomiceto cora-se muito bem pelo Azul de algodão lactofenol, é Gram positivo, como a maioria das leveduras, além de corar-se pelo Giemsa, Panóptico e pelo Lugol.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Toda metodologia para isolamento do *C. guttulatus* foi desenvolvida no Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) do Projeto Sanidade Animal/Embrapa/UFRRJ, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, após ser submetido à comissão de ética da UFRRJ recebendo o número de protocolo 009759. Seis animais (46,6 %) de um total de 15

cobaias adultas, oriundas de uma criação rústica do município de Seropédica, previamente constatadas positivas para *C. guttulatus* através do exame de uma gota de suspensão de fezes em água destilada, corada entre lâmina e lamínula pelo azul de algodão lactofenol, foram eutanasiadas em câmara de CO₂, conforme as recomendações do Cobeia (2012). Seus estômagos e cecos foram retirados, dando-se início, assim, ao isolamento de *C. guttulatus* de acordo com técnica para isolamento do leveduriforme em coelhos descrita previamente por Flausino e Baroni (2009).

Os isolados de *C. guttulatus* obtidos foram mantidos em laboratório, por sucessivas sementeiras, a cada 72 horas, nos mesmos meios de cultura utilizados no processo de isolamento citado a seguir.

3.2.1. Descrição da Técnica de isolamento

Apesar de ser considerado como um microrganismo de grande dificuldade de isolamento e manutenção (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958; SHIFRINE; PHAFF, 1959; RICHLE; SCHOLER, 1961; BUECHER; PHAFF, 1970; PHAFF; MILLER, 1971; BUECHER; PHAFF, 1972; ZIERDT et al, 1988), este leveduriforme foi isolado e mantido, através de sucessivas sementeiras, tornando-se viável por longo período de tempo para provas complementares de identificação .

Após a eutanásia, os segmentos intestinais e os estômagos tiveram as extremidades fechadas, com auxílio de barbante embebido em álcool iodado, antes de serem removidos. O material removido foi lavado externamente e submetido à assepsia com álcool 70%GL. Após este procedimento, foram submetidos a incisões longitudinais, sendo que no caso dos estômagos, foram realizadas nos bordos inferiores (curvatura maior).

Foi utilizada a técnica desenvolvida por Phaff e Miller (1971), modificada por Flausino e Baroni (2009), para obtenção dos isolados, onde, de cada estômago e ceco, foi coletado cerca de 1g de seu conteúdo, procedendo-se à inoculação asséptica em 50 mL de caldo YPG modificado (Extrato de levedura 1%, peptona de proteose 1%, glicose 2%, antibiótico (Ampicilina) 3 mg/mL e pH 3,0 ajustado com 1N HCl), previamente autoclavado a 120°C durante 15 minutos e resfriado a temperatura ambiente, acondicionados em Erlenmeyer de 125mL, com incubação a 37°C, por 24 a 48 horas em estufa bacteriológica. Findo o período de incubação, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas das culturas para novos frascos com

meios de mesma composição, sendo submetidos às mesmas condições de incubação. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, após a última incubação, uma alíquota de 0,1mL de cada cultura foi transferida para meio sólido, YPGA modificado (Extrato de levedura 1%, peptona de proteose 1%, glicose 2%, antibiótico, agar-agar 2% e indicador de pH ácido), contido em placas de Petri (20 mL por placa). As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas sob condição de baixa concentração de O₂, elevada concentração de CO₂ (10-20%) e saturação de umidade. Estas condições foram obtidas mediante combustão no interior do recipiente hermeticamente fechado (jarra de vidro), utilizando-se vela de parafina, comprimido efervescente gerador de CO₂ (opcional) e Becker de 100 mL contendo água destilada.

Após o isolamento, as colônias isoladas em YPGA modificado foram semeadas em meios líquidos e sólidos, de mesma composição que os citados anteriormente, de forma alternada e incubados sob as mesmas condições, para sua manutenção por longo período visando análises morfológicas e identificação genotípica.

3.2.2. Isolamento do DNA.

Os procedimentos mais comuns utilizados na identificação desse ascomiceto seriam baseados na morfologia da levedura e nas provas bioquímicas como testes de fermentação e assimilação de carboidratos (RICHLE; SCHOLER, 1961; BUECHER; PHAFF, 1970; FLAUSINO; BARONI, 2009). Entretanto, a intensa rotina de identificação de *C. guttulatus* possibilita ao observador experiente, que pode ser feita através do aroma da cultura (*sui generis*), do arranjo e morfologia das células das colônias observadas sob microscopia óptica invertida, com objetivas de 10 e 40X, acrescida à característica da coloração (âmbar ao marrom) de suas colônias no meio de cultura YPGA modificado com indicador de pH ácido (FLAUSINO; BARONI, 2009). Na identificação microscópica das colônias foi utilizado um microscópio óptico invertido da marca OPTON® (RFA), sendo as fotomicrografias registradas através de máquina PANASONIC LUMIX F2® (Japão). Com o advento da biologia molecular, várias espécies de ascomicetos, dentre elas espécies do gênero *Candida* e de outros gêneros anamórficos, passaram a ser identificadas através das sequências D1/D2 do gene 26S rDNA. Desta maneira, o uso dessa técnica facilitou, com precisão, a identificação desses leveduriformes, requerendo com isso um menor trabalho, comparando-se com o uso dos testes de zimograma e auxanograma (KURTZMAN; ROBNETT, 1999).

3.2.3. Descrição da técnica de extração do DNA.

Sob condições de esterilidade, em uma câmara de fluxo laminar, uma única colônia de *C. guttulatus* isolada em YPGA modificado foi alçada e re-suspensa em 250 µL de solução gelada de salina fosfatada (PBS) tamponada (pH 7,2), em um tubo de microcentrífuga de 1,5mL com tampa rosqueada e esterilizados, contendo aproximadamente 50mg de esferas de vidro (Sigma-Aldrich; produto # G8772) previamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 10% e esterilizados, com diâmetros entre 425-600 microns. Os tubos foram colocados numa mini-beadbeater-16 aparelhos (Biospec; Bartlesville, EUA), e as células foram lisadas utilizando-se um único ciclo de agitação (60 s). A lise celular foi completada com a adição de 250 µL de uma solução de ruptura celular (Tris 20 mM-HCl, 20 mM de EDTA, 400 mM NaCl, 1% de dodecil sulfato de sódio), sendo o lisado incubado durante 15 min a 56 °C. Após, o DNA foi extraído por tratamentos individuais de fenol e fenol/clorofórmio, seguido de precipitação com um volume igual de isopropanol durante 20 minutos à temperatura ambiente. O DNA precipitado, resultante da centrifugação a 13,000 G durante 15 min, foi dessalinizado duas vezes com etanol a 70%GL e re-suspensão, ficando durante uma noite a 4 °C em 50 µL de água purificada biolmol/grade (Sigma-Aldrich), com posterior armazenamento a -20°C.

3.2.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA.

No presente estudo, foi realizada a amplificação por PCR de um fragmento de aproximadamente 600 pb (região do domínio D1-D2) do gene que codifica o RNA ribossomal 26S, a partir de três culturas puras de *C. guttulatus* que haviam sido isolados a partir de um coelho (FLAUSINO; BARONI, 2009), um cão da raça husky (FAUSINO et al., 2012) e de uma cobaia. Os iniciadores e as condições de reação de PCR foram baseados nos relatos de Kurtzman e Robnett (1998). Os iniciadores (*Primers*) empregados foram NL1 (5'-TGCTGGAGCCATGGATC-3') e NL2 (5'-AACGGCTTCGACAACAGC-3'). Uma alíquota (5µl) de cada reação de PCR foi examinada por eletroforese em gel de agarose para confirmar a presença do fragmento amplificado apropriado. É importante salientar que os iniciadores utilizados neste estudo são universais para o domínio D1-D2 fúngicos, em vez de ser espécie específico. Devido a isso, foi necessário confirmar que os produtos de amplificação gerados por PCR originaram de uma única espécie e também confirmar se eles seriam provenientes de

C. guttulatus. Para resolver essa questão, foi empregado o método de PCR-RFLP. Inicialmente, utilizou-se análise de digestão (in silico), empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA), de sequências que codificam o domínio D1-D2 de uma variedade de espécies de leveduras, incluindo aquelas associadas à microbiota fúngica normal de cães no Brasil (BRITO et al., 2009) e duas sequências de *C. guttulatus*, depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Esta análise revelou que seria possível gerar padrões de bandas específicas para cada uma das diferentes espécies de leveduras e que as enzimas Msp I, Hae III e Dde I poderiam ser usadas para fornecer padrões de bandas distintas e caracterizar *C. guttulatus*.

Os produtos oriundos da PCR foram tratados com T-exo-SapT (USB) de acordo com o protocolo do fabricante e sequenciados em ambas as direções (5'-3' e 3'-5'), utilizando-se os iniciadores de amplificação para fornecer dados de sequência não ambíguas, através da utilização da mistura de reação BigDye Ready (ABI Corp); produtos da reação foram analisadas num analisador Prism DNA 3700 automático (ABI Corp). Alinhamentos de sequência foram executados utilizando Sequencher (versão 4.10.1, Genecodes Corporation, CA, EUA). Todas as sequências foram inseridas no algoritmo de busca BLAST e o banco de dados NCBI para determinação da identidade genética.

3.2.5. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram obtidas com auxílio de um microscópio binocular modelo Primo star, Zeiss (RFA) acoplado a uma câmara digital modelo AxioCam ERc5s (RFA) e PANASONIC LUMIX F2® (Japão).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. *Cyniclomyces guttulatus*

3.3.1.1. Identificações fenotípicas de isolados de *Cyniclomyces guttulatus* procedentes de cobaios.

Foi observado o crescimento de varias colônias que, ao exame com microscópio invertido, apresentaram morfologia e arranjos celulares típicos de *C. guttulatus*, de acordo

com Saito et al. (1984), Kurtzmann e Robnet (1998), Neel et al. (2006), Flausino e Baroni (2009) e Flausino et al. (2012). O exame microscópico de fragmentos de colônias e alíquotas de cultivo em caldo, entre lâmina e lamínula, coradas pelo azul de algodão lactofenol, também mostraram características celulares condizentes com o leveduriforme (Figura 1).

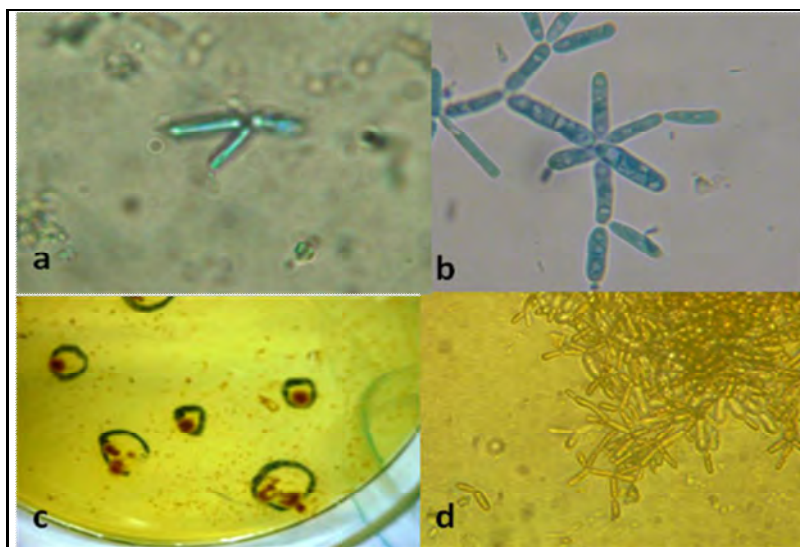


Figura 1. Morfologia dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* procedentes de *Cavia porcellus* de criações rústicas. Fotomicrografia de célula com brotamentos (a) em sedimento procedentes de fezes frescas de cobaio. Azul de Algodão. Obj. 40X.; Fotomicrografia de pseudohifas (b) em caldo YPG. Azul de Algodão. Obj. 40X.; Foto de colônias (c) em crescimento (círculos) em placa de Petri, 5X; Fotomicrografia de colônia individual onde se observa bordos em crescimento (d). Meio YPGA, 10X em microscopia invertida.

3.3.1.2. Análise genotípica

3.3.1.2.1. Análise molecular de *Cyniclomyces guttulatus*

Os resultados da subsequente análise *in vitro* de digestão com as enzimas de restrição confirmaram os achados do estudo baseado em bioinformática e validaram a utilização da técnica de PCR-RFLP como um método conveniente para a caracterização dos isolados obtidos. Comparações do perfil molecular de *C. guttulatus* com outras leveduras (Tabela 1)

foram feitas, onde se evidencia as diferentes bandas de diferentes pesos moleculares, diferenciando-as (Figuras 2 e 3). Além disso, pode-se notar a semelhança entre os pares de bases observados em amostras de *C. guttulatus* procedentes de coelhos de criações de uma mesma região (Figura 4).

Tabela 1. Comparações do perfil molecular de *Cyniclomyces Guttulatus* com outras leveduras em pares de base (pb).

DNA / Enzima	Dde I	Hae III	Msp I
<i>Cyniclomyces guttulatus</i> (U76196.1)	327, 164, 53, 47	437, 154	388, 96, 59, 40, 8
<i>Candida humilis</i> (JQ585727)	293, 211, 52, 26	439, 63, 61, 19	443, 65, 58, 16
<i>Kazachstania pintolopesii</i> (AY545573.1)	293, 211, 50, 18	322, 109, 61, 61, 19	443, 111, 10, 8
<i>Malassezia pachydermatis</i> (DQ915500.1)	192, 189, 176, 16	--	--
<i>C. parapsilosis</i> (JF766622.1)	284, 202, 71, 6	381, 111, 53, 18	395, 168
<i>C. tropicalis</i> (JN088216.1)	290, 212, 45, 42	227, 206, 138, 18	--
<i>C. albicans</i> (HQ876051.1)	341, 212, 40	301, 144, 130, 18	245, 148, 132, 68
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (JQ219350.1)	293, 211, 69, 18	322, 160, 109	583, 8
<i>Rhodotorula glutinis</i> (JQ219317.1)	521, 50, 46	430, 187	407, 172, 38
<i>Cyniclomyces</i> sp. (FJ755179.1)	327, 164, 23, 19	413, 120	388, 80, 40, 25
<i>C. guttulatus</i> coelho	326, 163, 53, 28, 18	416, 154, 18	386, 95, 59, 40, 8 *
<i>C. guttulatus</i> cão	328, 164, 53, 43	434, 154	388, 97, 59, 40, 4 *
<i>C. guttulatus</i> cobaio	293, 211, 35, 21	431, 61, 49, 19	443, 97, 10, 10 *

* Presente estudo

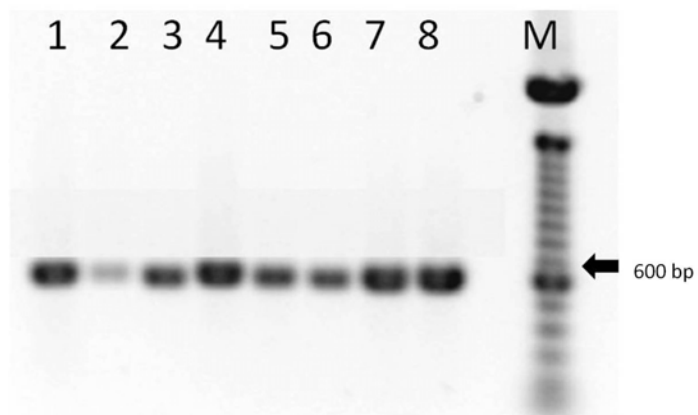


Figura 2. Gel de agarose (1,5%) de electroforese de um fragmento com aproximadamente de 600 pares de bases (gerado por amplificação por PCR com base na região variável D1-D2 do gene codificador do rRNA 26S), a partir de um painel de espécies de leveduras. (1) *C. guttulatus* isolado de Cão, (2) de *C. guttulatus* isolado Coelhos, (3) *Kazacchstania* sp. isolado de cobaio, (4) *Cyniclomyces guttulatus* isolado de cobaio, (5) *Saccharomyces cereviseae*, (6) *Candida albanata*, (7) *C. parapsilosis*, (8) *C. albicans*, (M) Marcador = 100 bp ADN. A posição da banda de 600 pb é mostrada com uma seta.

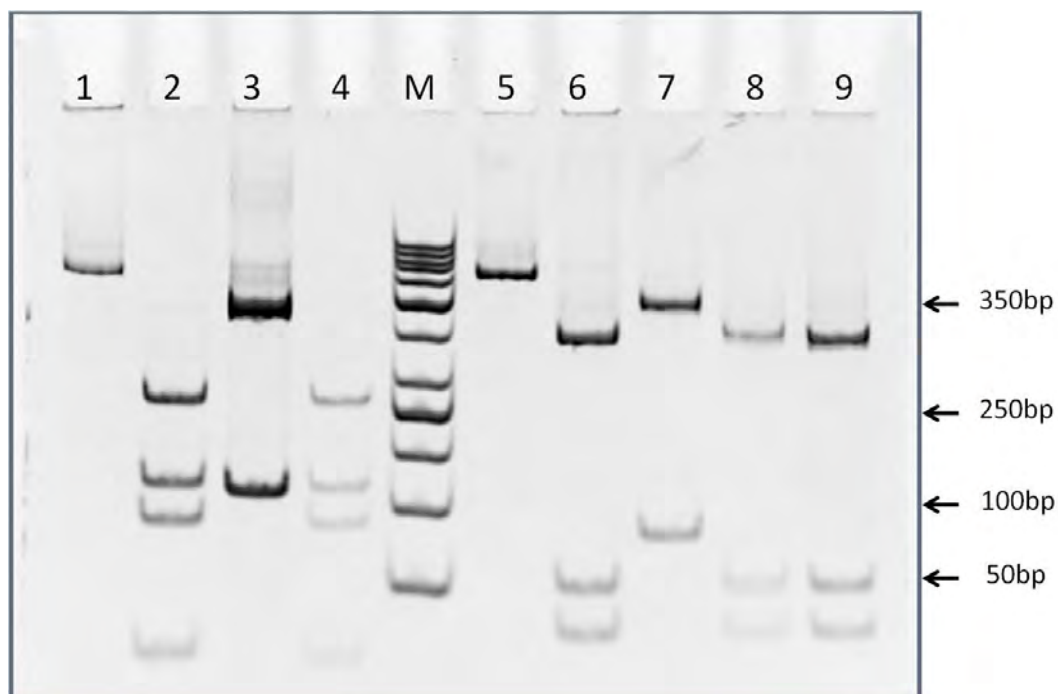


Figura 3. Padrões de bandas de restrição gerados a partir da digestão de amplicons D1-D2 usando uma enzima *MspI*. (1) Sem digestão, (2) *Candida albicans*, (3) *C. parapsilosis*, (4) *C. albanata*, (M) marcador de 50 pb (5), *Saccharomyces cerevisiae*, (6) *Cyniclomyces guttulatus* (cobaio), (7) *Kazachstania* sp. (cobaio) (8) *C. guttulatus* (coelho) e (9) *C. guttulatus* (Cão). Gel de Acrilamida a (12%). As posições dos marcadores representativos são mostradas ao lado direito da figura.

No início deste estudo, apenas duas sequências, que representam o domínio D1-D2 de *C. guttulatus*, estavam disponíveis no Genbank. A primeira destas cepas (NRRL/Y-17561) foi isolada a partir de um coelho (Genbank número de acesso U76196), depositada por Kurtzman e Robnett (1998). A segunda sequência foi amplificada a partir de um isolado de *C. guttulatus* associada à diarreia em cães (número de acesso Genbank FJ755179), na Noruega

(GJERDE et al., 2009). Em 2012, foram realizados sequenciamentos do domínio D1-D2 de estirpes de *C. guttulatus* isolados de um coelho e de um cão (Husky siberiano) no Rio de Janeiro (FLAUSINO et al., 2009). A análise comparativa da sequência do amplicon derivado da cepa husky (GenBank número de acesso JQ861266) revelou um grau de homologia de sequência nucleotídica de 99% (8 nucleotídeos diferentes em um total de 593 nucleotídeos), com o fragmento amplificado a partir da cepa NRRL/Y-17561, derivada do coelho (número de acesso Genbank U76196); depositado por Kurtzman e Robnett em 1998.

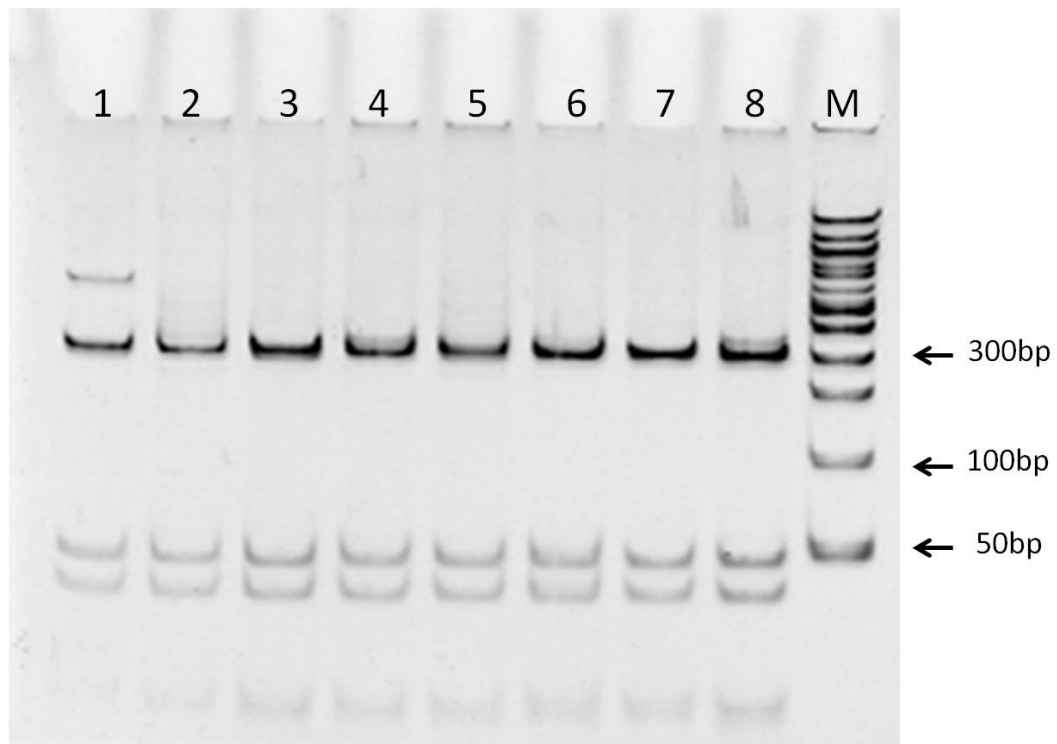


Figura 4. Padrões de bandas geradas a partir de digestão com enzima de restrição a partir de amplicons D1-D2 de oito colônias de *Cyniclomyces guttulatus* (1-8) isoladas de Coelhos, usando uma enzima MspI. Gel de Acrilamida a (12%). As posições dos marcadores representativos são fornecidas no lado direito da figura.

Além disso, a cepa isolada de cão no Rio de Janeiro demonstrou um nível de 98% de homologia de sequência nucleotídica (8 diferenças de nucleotídeos em um total de 533 nucleotídeos), com a sequência amplificada a partir de um isolado de *C. guttulatus* associada à diarreia em cães (número de acesso Genbank FJ755179) na Noruega (GJERDE et al., 2009).

O sequenciamento de amplicons, gerado a partir da cepa derivada de um coelho brasileiro, depositada no GenBank sob número de acesso JQ861267, para o algoritmo de busca BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), revelou uma homologia de 97% (15 diferenças de nucleotídeos de um total de 533 nucleotídeos) quando comparado ao sequenciamento da cepa recuperada a partir de um cão Norueguês (acima citado), e um nível de homologia de 96% (24 diferenças de nucleotídeos de um total de 592 nucleotídeos) com a sequência U76196. Finalmente, uma comparação entre as sequências JQ861267 (coelho brasileiro) e JQ861266 (Husky siberiano), demonstrou um nível de 96% de homologia de sequência nucleotídica (19 diferenças de nucleotídeos de um total de 592). Análise com base no sequenciamento do domínio D1-D2, amplificado a partir da cepa de *C. guttulatus* isolado de cobaia revelou um nível de homologia de 100% com a sequência JQ861267, derivada de uma cepa de *C. guttulatus* recuperada de um coelho brasileiro (FLAUSINO; BARONI, 2009) (Figura 5). A sequência derivada de cobaia foi depositada no GenBank com o número de acesso KC484339.

A observação de que a cepa isolada de cobaia mostrou um nível de 100% de homologia com a cepa recuperada a partir de um coelho brasileiro independente da enzima de restrição utilizada. Porém, mostrou um nível reduzido de homologia com as cepas isoladas de cães (da Noruega e do Brasil) sendo de grande interesse. Os níveis observados de polimorfismos nucleotídicos do domínio D1-D2, das sequências atualmente depositadas no GenBank como *C. guttulatus* (onde a sequência U76196 é considerada como espécie tipo), foram substancialmente mais elevados do que os níveis registrados para outras espécies de leveduras ascomicetos, em que a divergência de sequência de nucleotídeos entre as cepas da espécie tipo e as cepas co-específicas foi, em geral, menor do que 3 nucleotídeos, embora para um número limitado de espécies um total de 6 substituições de nucleotídeos foram observadas (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Diante dos níveis elevados de polimorfismos associados às sutis diferenças em características morfológicas observadas para a cepa canina brasileira (FLAUSINO et al., 2012), vale a pena considerar a possibilidade de que o gênero *Cyniclomyces*, pode de fato conter mais do que uma única espécie, tal como foi sugerido anteriormente por Gjerde et al. (2009), onde um total de 11 substituições de nucleotídeos (em um total de 533 nucleótidos) foram registrados entre a amostra canina recuperada na Noruega (FJ755179) e a cepa NRRL/Y-17561. Análise com base no sequenciamento de outras regiões do genoma como, por exemplo, os espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, como foram aplicados a outras espécies de ascomicetos, será necessária para resolver esta questão taxonômica.

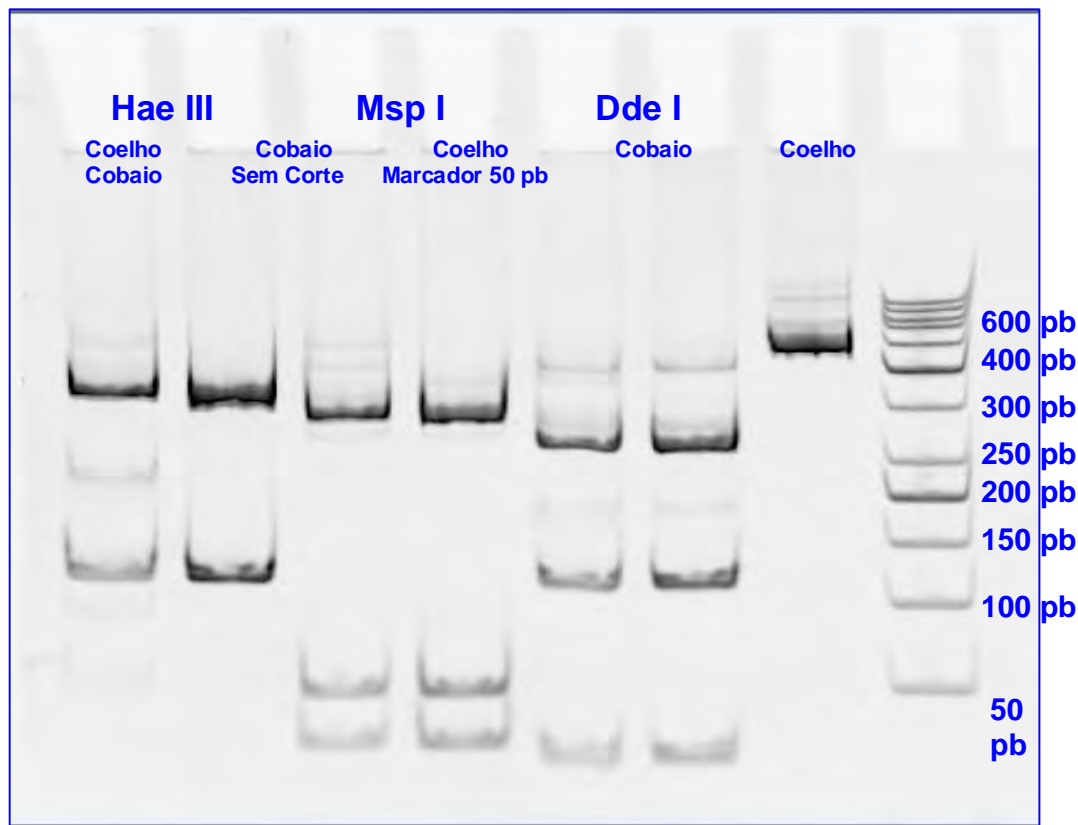


Figura 5. Padrões de bandas geradas por digestão com enzimas de restrição a partir de D1-D2 amplicons de *Cyniclomyces guttulatus* isolados de coelho ou cobaio usando três enzimas de restrição (HaeIII, MspI e DdeI). (M) marcador de 50 pb, em gel de Acrilamida (12%). As posições dos marcadores representativos estão no lado direito da figura.

3.3.1.2.2. Análise por sequenciamento

As ampliações dos DNAs pela PCR que procederam de uma colônia individual isolada de cobaio, de uma colônia isolada de coelhos previamente identificada como *C. guttulatus* (FLAUSINO; BARONI, 2009) e de um isolado de *C. guttulatus* proveniente de uma colônia isolada de um Husky siberiano (FLAUSINO et al., 2012), geraram *amplicons* com mobilidade esperada em géis de agarose. Ao comparar as sequências dos *amplicons* do isolado do Husky (GenBank número de acesso JQ861266) revelou que 99% de homologia na sequência de nucleotídeos (8 nucleotídios diferentes em 593 nucleotídeos) em comparação

com o *amplicon* do isolado de coelho NRRL/Y-17561 (Genbank número de acesso U76196) depositado por Kurtzman e Robnett (1998). Além disso, o isolado de cobaio de criações rústicas identificado neste trabalho foi idêntico ao depositado por Kurtzman e Robnett (1998) no Genbank para coelhos e com o isolado de coelhos do Brasil (GenBank número de acesso JQ861267), sendo que, a comparação entre os *amplicons* resultou num nível de 100% de homologia dos nucleotídeos.

Assim, o sequenciamento do DNA mostrou não haver diferença estrutural entre a cepa de *C. guttulatus* isolada de coelhos e a de cobaios; enquanto, que a do isolado de cão não possui o mesmo perfil genético observado anteriormente.

3. Parte 2. IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Eimeria caviae* SHEATHER, 1924 (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) E SUA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM COBAIOS (*Cavia porcellus*, LINNAEUS, 1758).

4.1. REVISÃO DE LITERATURA

4.1.1. Classificação

Eimeria caviae é um coccídio pertencente ao filo Apicomplexa. Até o presente momento essa classificação tem sido baseada no complexo apical de eucariotos que possuem diferentes formas infectantes conhecidas como zoítos. Comparando as propostas de Levine et al. (1980), Cox (1981), Corliss (1994) e Upton (2000) poder-se-á classificá-lo como:

DOMINIO: Eukaryota Cavalier-Smith, 1998

REINO: Protozoa (Goldfuss, 1818) R. Owen, 1858

INFRAREINO: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

FILO: Myzozoa, Cavalier-Smith e Chao, 2004

SUBFILO: Apicomplexa Levine, 1970

CLASSE: Conoidasida Levine, 1988

SUBCLASSE: Coccidiasina Leuckart, 1879

ORDEM: Eucoccidiorida Léger e Duboscq, 1910

SUB-ORDEM: Eimeriorina Léger, 1911

FAMÍLIA: Eimeriidae Minchin, 1903

GÊNERO: *Eimeria* Schneider, 1875

ESPÉCIE: *Eimeria caviae*, Sheater, 1924

4.1.2. Tipo morfológico

Sheater (1924) estudou o ciclo de vida deste protozoário e deu-lhe o nome de *E. caviae*. Observou que os estágios de desenvolvimento ocorriam somente no epitélio do colon, especificamente na porção superior, decrescendo em direção ao reto.

Henry (1932) estudou a coccidiose em porquinhos- da Índia focando seu ciclo de vida. Observou oocistos medindo 12,8 – 25,6 x 12,8 – 22,4 µm e notou que estes eram diferentes

das medidas encontradas por Bugge e Heinke (1921), e Sheater (1924). Verificou ainda que a coloração de sua parede era marrom na maioria dos oocistos. Sua parede media $0,8\mu\text{m}$ e que seus esporocistos apresentavam resíduos na parte central e mediam $11,0 - 13,0 \times 6,4 - 7,0\mu\text{m}$.

Zuart et al. (1961), pensavam que *E. caviae* e *E. dolichotis* fossem uma só espécie e infectaram cobaios com esta última, constatando o contrário, tendo em vista que os oocistos desta não foram eliminados nas fezes destes animais. As medidas dos oocistos esporulados de *E. caviae* variaram de $17,0 - 27,0 \times 14,0 - 22,0 \mu\text{m}$ a $17,62 - 20,96 \mu\text{m}$, com IM igual a $1,2 \mu\text{m}$ variando de subesféricos a elipsoidais. As paredes eram lisas, não apresentavam micrópila, com resíduos de esporocistos presentes e de oocistos ausentes. Os esporocistos mediram $8-13 \times 5-7 \times 10,86 - 5,11\mu\text{m}$. Apresentavam corpo refrátil nos esporozoítos e seu tempo de esporulação não foi observado.

Moore (1976) em seu trabalho de tese infectou cobaios experimentalmente e realizou um estudo para obter dados sobre as características morfológicas e citológicas dos esporozoítos de *E. caviae*. Os oocistos mediram em média $22,6 \times 20,8\mu\text{m}$. Observou também, os períodos, pré-patente e patente, sintomatologia e patologia. Oocistos esporulados apresentavam parede dupla e lisa, eram elipsoidais, de coloração marrom-amarelado, não apresentavam corpo residual, tinham corpo de Stieda cônico e tinham resíduo do esporocisto ligado à membrana de sua parede. Os esporozoítos foram estudados em preparações a fresco, e também corados pelos métodos de Giemsa, hematoxilina de Harris e eosina, PAS e Feulgen. Além disso, este mesmo autor observou que a fresco, esses eram móveis, rotativos, flexíveis e agiam como sondas perfurativas. Eram curvos com uma extremidade afilada e outra arredondada. Possuíam dois corpos refrateis (anterior e posterior), com um núcleo sem nucléolo entre eles. Corados, apresentavam corpos refringentes, grânulos citoplasmáticos e núcleo com cromatina periférica, além de nucléolo.

Bugge e Heinke em 1923 observaram a presença de oocistos no colón de cobaios, com diâmetro maior variando de $15,9$ a $24,6 \mu\text{m}$ e diâmetro menor variando de $12,2$ a $17,4\mu\text{m}$. A média foi de $20,0 - 15,0 \times 16,0 \mu\text{m}$. O tempo de esporulação em temperatura ambiente iniciou com 2-3 dias e terminou com 5-8 dias (HENRY, 1932).

Lapage (1940) observou ainda que o núcleo do parasito, provavelmente macrogametócito, tem um grande cariossomo e não contém quaisquer hastes de cromatina, ou grânulos que se assemelham a cromossomas, na área extracariossomática. A divisão nuclear

assemelha-se a de muitos outros coccídios. Salientou a importância de reconhecer as diferentes formas apresentadas pelo núcleo quando corados por vários métodos de coloração.

Muto et al. (1985 b) observaram que os oocistos variaram de subsféricos a elipsoidais, sem micrópilas, medindo 20,0 x 17,0µm, com um tempo de esporulação de 2-3 dias. O período pré-patente foi de 11 dias.

4.1.3. Biologia

Matsui et al. (1996), infectaram cobaias com oocistos esporulados de *E. caviae* obtidos de infecção natural e purificados, com apenas um oocisto esporulado pela técnica de Dubey (1979), reduzindo, após sucessivas infecções, o período pré-patente de 11-12 dias para 6 dias. As infecções posteriores, feitas com as cepas com período pré-patente reduzido não mostraram sintomatologia, com animais infectados com $2,4 \times 10^4$ oocistos esporulados, o que demonstrou a atenuação da cepa obtida. Foi demonstrado, pela histopatologia, que tanto as cepas atenuadas quanto as selvagens não apresentaram diferenças morfológicas, quando localizadas nas criptas das células do epitélio do ceco e do cólon. Tanto esporozoítos quanto merozoítos de ambas as cepas foram observados no 1º e 2º DAI, assim como esquizontes maduros, sendo estes últimos em maior quantidade a partir do 4º DAI, contendo de 2 a 16 merozoítos. As gerações assexuadas não foram determinadas. Estágios sexuais foram observados a partir do 10º DAI na cepa original e do 4º DAI na cepa precoce, atenuada. A transição entre gametócitos e oocistos foi de 2 dias em ambas cepas.

Iijima et al. (1989) para testar ação de duas drogas a base de sulfas, infectaram dois grupos de cobaias, um massivamente, com $2,2 \times 10^6$ oocistos esporulados e outro levemente, com $2,2 \times 10^2$ oocistos esporulados, avaliando o efeito das drogas através da sintomatologia e pelo OoPG (Oocistos Por Grama de fezes). No grupo massivamente infectado, todos os animais do subgrupo controle, não tratados, tiveram sintomas clássicos de eimeriose a partir do 10º DAI, período pré-patente de 11 dias e morte no 13º DAI. No grupo sob infecção leve os animais controles apresentaram período pré-patente de 13 dias.

Moore (1976) observou que o período pré-patente foi de 11-13 dias (reduzido para 5-6 dias por sucessivas passagens) e o patente foi de 7-13 dias. A esporulação foi induzida segundo a técnica de Tizzer, 1929, em placas de Petri com solução aquosa de $K_2 Cr_2 O_7$ (

Dicromato de Ptássio) a 2,5 % (HENRY, 1932). O período de esporulação teve início com 24 horas e término com 48 – 72 horas, em temperatura ambiente.

Lapage (1940) confirmou que a incidência de *E.caviae* em cobaios é muito elevada. Exames diários para detecção de oocistos deviam ser feitos antes de um animal ser considerado negativo. Observou que oocistos de *E. caviae*, esporulados em 9-11 dias, quando misturados com uma variedade de soluções aceleradoras de esporulação, entre 18°C e 22°C, com ou sem aeração, perderam a viabilidade com o passar do tempo, mas, com até sete dias nas soluções, podem produzir infecções maciças.

Henry (1932) verificou que o tempo de esporulação iniciou no 4º dia e terminou com 4-8 dias.

4.1.4. Clínica e Patologia

Lapage (1940) verificou que o protozoário desenvolve-se no cólon e que, em infecções pesadas, sua totalidade é afetada. Notou que, geralmente, muito pouca mudança ocorre nos tecidos do cólon, mesmo quando grandes quantidades de coccídios estão presentes e que a taxa de mortalidade não se assemelha a da coccidiose em frangos.

Henry (1932) verificou que o parasito tem predileção pelas células epiteliais do cólon. Sete animais foram infectados e eutanasiados a cada dois dias após o 4º DAI, para estudo do ciclo de vida do protozoário, em diferentes estágios de desenvolvimento nas células do tecido epitelial do cólon. Ainda, enfatiza as observações de Strada e Traina em 1900 que, além de observarem a presença de coccídios no conteúdo intestinal de cobaios associados à diarreia, observaram também com frequência nódulos no fígado.

Muto et al. (1985a), realizaram um estudo clínico, patológico e parasitológico, no qual observaram a evolução da coccidiose natural e experimental em cobaios. De um total de 11244 animais adquiridos em 1968, 410 (3,6%) tiveram diarreia em consequência da coccidiose. Sua incidência foi elevada na primavera e no outono com mortalidade de 14,4%. Numa infecção experimental os animais apresentaram diarreia, desidratação, perda de peso e morte, com um percentual de mortalidade de 30%, a partir do 3º dia após o aparecimento da diarreia, indo até o 5º dia. O exame histopatológico mostrou hiperplasia do epitélio da

mucosa do cólon, e coccídios em diferentes estágios de desenvolvimento e grande quantidade de muco.

Moore (1976) constatou que os sintomas apresentados foram diarreia, inapetência, perda de peso, constipação, pelos eriçados, prostração e apatia.

Elis e Wright (1961) deram ênfase à histopatologia de órgãos afetados. Observaram manchas esbranquiçadas na mucosa externa do cólon, presença de líquido sanguinolento na cavidade peritoneal e ulcerações no tecido linfoide com reação inflamatória. Os oocistos encontrados mediam 18,0 x 15,0µm. Suas paredes eram bem definidas e apresentavam citoplasma com grânulos. Esquizontes, macrogametócitos e microgametócitos foram observados na mucosa do cólon. O período de esporulação durou 4 dias.

Kleeberg e Steenken (1963) relataram que as alterações que ocorrem na coccidiose por *E. caviae* são distensão abdominal, hiperemia da parede intestinal e minúsculos pontos hemorrágicos, além de nódulos brancos grisáceos correspondentes a fases de seu desenvolvimento.

Bugge e Heinke (1923) descreveram coccidiose em 78% de 180 animais de uma colônia de porquinhos-da-índia, com infecção mostrando elevado nível de inflamação intestinal ao morrerem. Chegaram a conclusão que a morte dos animais ocorreu mais pela desnutrição, devido a pobre alimentação que lhes era dada, do que pela ação do protozoário.

Eimeria caviae é frequente em cobaio e tem distribuição cosmopolita, seu desenvolvimento processa-se no cólon e que a merogonia (esquizogonia) ocorre entre 7º a 8º dia após a infecção (DAI). Seus oocistos variam de subsféricos a elipsoidais, medindo de 17-25 por 13-18µm (média = 19 x 16µm). Seu período pré-patente varia de 7-12 dias e a infecção ocorre em cerca de 40% dos animais, leve ou grave numa criação (SOULSBY, 1987).

4.1.5. Epidemiologia e diagnóstico

Apesar do amplo conhecimento sobre a importância da coccidiose em animais, de um modo geral, poucos tem se dedicado ao estudo dessa doença em animais de laboratório, em particular a eimeriose causada pela *E. caviae* em cobaios. Soulsby (1987) relatou que os animais domésticos são afetados pela maioria dos coccídios de importância econômica, sendo estes pertencentes ao gênero *Eimeria*. O mesmo se observa para roedores (DUSZYNSKI et al. 2011).

Muto et al. (1985b) ao examinar 7162 caixas de transporte de porquinhos-da-índia encontraram 53,8% de amostras positivas para *E. caviae*, e, em 1461 (39,0 %) animais mortos durante o período de quarentena. A doença atingiu principalmente animais desmamados e, raramente, adultos e lactantes.

Alves et al. (2007), fizeram um levantamento sobre a prevalência e intensidade de infecção de endoparasitos em cobaias convencionais provenientes de dois biotérios de criação e experimentação do município do Rio de Janeiro, avaliando-se a eficácia das medidas de prevenção entre eles. Os parasitos encontrados através da técnica de exame direto da mucosa e do conteúdo intestinal e de tricromo de Wheatley com as respectivas prevalências foram: *Balantidium* sp. (78%), *Cyathodium* sp. (68%), *E. caviae* (38%), *Paraspidodera uncinata* (34%) e *Giardia muris* (24%). Nos exames de fezes realizados foram encontrados os seguintes parasitos com as respectivas prevalências no 1º biotério: *E. caviae* (74%), *Balantidium* sp. (68%), *Cyathodium* sp. (68%) e *Cryptosporidium* sp. (5%). No 2º biotério, observou-se: *E. caviae* (58%), *Balantidium* sp. (42%), *Cyathodium* sp. (25%) e *G. muris* (8%).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Local de coleta e procedência das amostras

Tanto os animais doadores quanto os utilizados na fase experimental foram procedentes de criações extensivas, localizadas no município de Seropédica, RJ. Todos os animais foram doados ao final do experimento para uma das criações rústicas que previamente tinha sido feito o diagnóstico da presença do referido coccídio no plantel.

4.2.1.1. Amostras de *Eimeria caviae*

As amostras de fezes frescas, num total de quatro, foram coletadas de forma aleatória, de quatro criações extensivas de porquinhos-da-índia visitadas no município de Seropédica, RJ e trazidas para processamento no Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) - Projeto

Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ). Cada amostra foi examinada com a finalidade de determinar a presença de oocistos de coccídios. Das quatro criações visitadas somente uma (25%) foi positiva para *E. caviae*. Após a confirmação da positividade para o coccídio em questão, foram coletadas fezes de três (10%) animais positivos dentre um total de 30 (trinta) existentes na criação. O material foi processado para indução de esporulação dos oocistos, para futuras infecções experimentais.

4.2.1.2 Infecção experimental de porquinhos-da-índia com *Eimeria caviae*.

Fora utilizado um total de dez cobaios divididos em dois grupos de cinco animais (controle e infectados), sendo cada grupo composto de quatro animais da linhagem short hair albinos, obtidos em biotério de referencia (FIOCRUZ/RJ) e um animal mestiço bicolor/roseta de criação extensiva todos com idade aproximada de três meses com média de peso de 416,4 gramas. Todos foram previamente submetidos a exame de fezes diários, pelo método de centrífugo-flutuação de Sheater (1924), modificado por Duszynski e Wilber (1997), durante sete dias consecutivos, para verificar-se a possível presença de *Eimeria caviae*, helmintos e *Cyathostomum* *guttulatus*. Depois desse período, foram vermifugados e acondicionados, individualmente, em caixas plásticas com 60x40x20 cm, previamente lavadas com água fervente e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% e, após secas, forradas com areia higiênica comercial enquanto as grades tampas foram flambadas com o uso de uma vassoura de fogo. Após 15 dias o segundo grupo foi infectado com 10⁶ oocistos esporulados de *E. caviae* por animal. O inóculo foi obtido de uma infecção natural de um cobaio de uma das quatro criações caseiras visitadas, na periferia do Município de Seropédica (22° 44' 29" S e 43° 42' 19" W), Rio de Janeiro, Brasil e cultivado em garrafas plásticas contendo Dicromato de potássio a 2,5% em água destilada, na proporção de uma parte do primeiro para duas partes do segundo, para obtenção de forma esporulada, a infectante. Os oocistos esporulados foram recuperados por centrifugação a aproximadamente 400 x g durante dez minutos para retirada do Dicromato de Potássio, que é extremamente tóxico para os animais. Após, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado com solução salina a 0,85% em água por cinco vezes, pelo mesmo processo. Ao final, o sedimentado foi ressuspense em solução saturada de açúcar e submetido ao mesmo processo de centrifugação. Os oocistos esporulados foram recuperados pela técnica de Willis e ressuspensos na solução salina citada acima. Terminada esta operação, uma contagem dos oocistos foi realizada utilizando-se a técnica desenvolvida por

Menezes e Lopes, 1995, para estabelecimento da dose infectiva sendo, em seguida, feita a inoculação via oral, utilizando-se pipeta Pasteur descartável com capacidade para 3,0 mL. Para facilitar esta infecção os animais foram submetidos à dieta hídrica durante 24 horas.

As fezes de cada animal infectado foram coletadas totalmente a partir do 1º DAI, até o 21º DAI, para prevenir uma possível reinfecção, verificar os períodos pré-patente e patente, realizar análises morfológicas e morfométricas dos oocistos recuperados, após esporulação e fazer a contagem de oocistos por grama de fezes (OoPG).

Após cada coleta os forros foram descartados e as caixas lavadas, desinfetadas e novamente forradas, até o final do experimento.

Observações clínicas foram feitas para constatação de presença de sintomas e sinais característicos das eimerioses de um modo geral.

Os animais receberam ração apropriada (Nutricobaia®) com 22% de proteína bruta e água a vontade, sendo pesados antes do experimento (dia 0) e nos dias ímpares (a contar do 3º DAI), a partir do início do experimento, para avaliação de ganho de peso.

4.2.2. Análise laboratorial

4.2.2.1. Exame das fezes

Para recuperação dos oocistos das amostras constituídas de fezes frescas foi utilizada a técnica de centrífugo-flutuação de acordo com Sheather (1924), modificada por Duszynski e Wilber (1997). Para a quantificação dos oocistos por grama de fezes (OoPG) foi utilizada a técnica descrita por Menezes e Lopes (1995).

4.2.2.2. Esporulação dos oocistos

As fezes foram diluídas em solução aquosa de Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5% e colocadas em garrafas plásticas de 1/2 L, contendo a relação de 1/6 de fezes para 5/6 de solução, sob aeração forçada com auxílio de uma bomba de aquário modelo ACQ-012 (Boyu Industries Co. Ltd., RPC), em temperatura ambiente. O material foi observado diariamente até a verificação de que 80% dos oocistos estivessem esporulados, quando o processo foi considerado concluído.

4.2.2.3. Visualização dos oocistos

Após a esporulação dos oocistos, 1,0 mL da mistura contendo oocistos esporulados foi colocada em tubos de centrífuga de 50 mL, de fundo cônico e com tampa rosqueada, e centrifugada para remoção do Dicromato de potássio e recuperação do sedimentado. O sedimentado foi então ressuspensionado em solução salina a 0,85% e a mistura centrifugada durante 10 minutos a 500 x g (Fanem Excelsa[®] Mod. 206 BL, SP). Esta operação foi repetida por mais três vezes, quando o sobrenadante ficou totalmente límpido.

A seguir, o sedimento foi submetido à técnica de centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar, densidade 1.20 durante 10 minutos a 500 x g como descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynski e Wilber (1997). Depois de centrifugado, o conteúdo do tubo cônico foi completado com solução saturada de açúcar até a formação de um menisco convergente na superfície do tubo, sobre o qual foi colocada uma lamínula de 24 x 32 mm e deixada por um período de 10 minutos. Após este período, a lamínula foi retirada e depositada cuidadosamente sobre uma lâmina previamente desengordurada e seca e, examinada em um microscópio binocular Carl Zeiss (RFA) com objetivas de 40 e 100X com a finalidade de visualizar as estruturas morfológicas.

4.2.2.4. Mensuração dos oocistos

Foram mensurados 150 oocistos esporulados e íntegros de *E. caviae*, sendo 50 de tamanho pequeno (sub-esféricos), 50 de tamanho médio (elipsoidal) e 50 de tamanho grande (ovoidal). Para tanto se utilizou uma ocular micrométrica K-15X PZO (Polônia), acoplada ao microscópio binocular Carl Zeiss. Os oocistos e esporocistos foram mensurados em seu diâmetro maior (DM) e menor (dm) e suas medidas foram dimensionada em μm . Além disso, foi calculado o índice morfométrico (IM) que é a razão entre o DM/dm, tanto para os oocistos, quanto para os esporocistos (Figura 6).

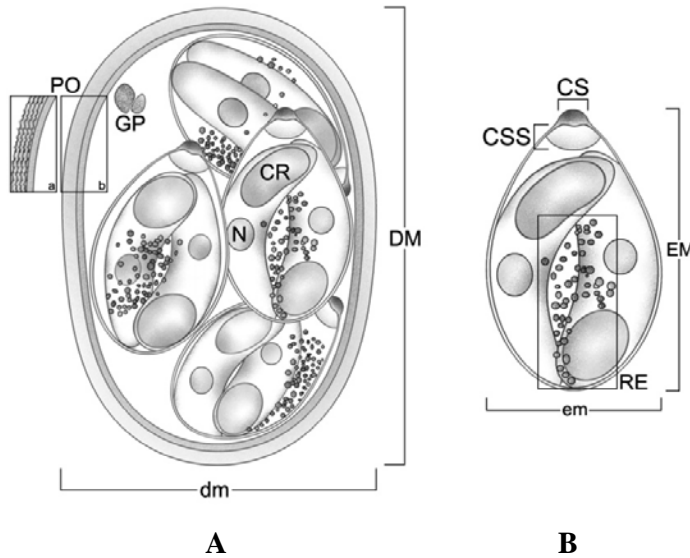


Figura 6. Desenho esquemático de um oocisto esporulados do gênero *Eimeria*. Abreviações. **(A) oocisto:** diâmetros, maior (DM) e menor (dm); parede do oocisto dividida em duas camadas (PO), membranas, externa rugosa (a) e lisa (b); Grânulo polar (GP); corpo refrátil (CR); núcleo (N). **(B) esporocisto:** diâmetros, maior (EM) e menor (em); corpos, de stieda (CS) e de substieda (CSS); resíduo do esporocisto (RE). (BERTO, 2010, modificado).

4.2.2.5. Desenhos e fotomicrografias dos oocistos

Os oocistos encontrados neste estudo foram esquematizados com auxílio de uma câmara clara acoplada a um microscópio binocular Wild M-20 e fotografados com auxílio de uma microscópio binocular modelo Primo Star Zeiss (RFA) com câmera digital AxioCam ERc5s Zeiss (RFA).

4.2.2.6. Identificação dos oocistos esporulados de *Eimeria caviae* por suas características morfológicas.

Para identificação dos oocistos recuperados das fezes de cobaios se utilizou como base as características fenotípicas, destacadas por Tenter et al. (2002) e as descrições morfológicas dos oocistos esporulados assinaladas por Duszynski e Wilber (1997) que auxiliam na

classificação destes coccídios. As características morfológicas descritas na figura 6, quando necessárias foram utilizadas na descrição dos oocistos de *E. caviae*.

4.2.3. Diagnóstico e identificação molecular.

Os oocistos esporulados de *E. caviae* mantidos em solução aquosa de Dicromato de Potássio a 2,5% foram submetidos à centrifugação, em tubos de fundo cônico de 50 mL a 500 G, em centrífuga por dez minutos. Após, o sedimentado foi suspenso em solução tampão PBS pH 7,5 e novamente centrifugado sob as mesmas condições. A operação foi repetida por mais quatro vezes, retirando, assim, toda solução de Dicromato de Potássio. O sedimento foi submetido à técnica de centrífugo-flutuação descrita por Sheather (1923), modificada por Duszynski e Wilber (1997). Após, os oocistos foram recuperados no sobrenadante e lavados em solução tampão PBS, com as mesmas características que a do processo anterior e da mesma forma citada acima, por três vezes. O sedimento resultante da última centrifugação foi suspenso em 5,0 mL e mantido sob-refrigeração para próxima etapa.

4.2.3.1. Extração do DNA e Identificação por PCR do isolado de *Eimeria caviae* procedente de *Cavia porcellus*.

Cerca de 1.000 oocistos esporulados de *E. caviae* foram re-suspensas em 300 µl de solução para desagregação de células (Tris 20 mM-HCl, EDTA 20 mM, 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS), em conjunto com 20 µl de proteinase K (20 mg/ml, Sigma Aldrich), seguido por incubação durante uma a noite a 56 °C. O DNA foi extraído por períodos individuais de tratamento com fenol e com fenol/clorofórmio, seguida por precipitação com um volume igual de isopropanol durante 20 minutos à temperatura ambiente. O DNA precipitado (16.000 x g durante 15 min), foi dessalinizado duas vezes com etanol a 70% e re-suspenso durante a noite a 4 °C em 50 µl de água. A grau biologia molecular (S B a-Aldrich®, EUA), com posterior armazenamento a -20 °C.

Para a reação da cadeia de polimerase foi montada uma mistura com volume final de 12,5 µL para cada mini-tubo, sendo 11,5 µL de reagentes (7,775 µL de H₂O; 1,25 µL de sol. tampão 10 x conc.; 0,375 µL de MgCl₂ (50mM); 1,0 µL de dNTP's (2.5 mM cada); 1,0 µL de "primer" (10 µM cada), 0,1 µL de Platinum™ Taq polimerase (5 unidades/µL) e 1,0 µL de DNA. Foram empregados os iniciadores específicos para o gênero *Eimeria*

(KAWAHARA et al., 2010), E-genusF (5' GCA AAA GTC GTA ACA CGG TTT CCG 3') e E-genusR (5' CTG CAA TTC ACA ATG CGT ATC GC 3'). A amplificação foi realizada em tubos de 0,2 mL (Labcon, EUA) em termociclador (Biometra®, EUA) sob as seguintes condições: um ciclo de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 60 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos, foram avaliados pela eletroforese a 75 volts por 45 minutos em gel de agarose a 1,5% (Sigma, A9539) corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador UV (Biorad).

Experiências iniciais foram realizadas para determinar o limite de detecção do ensaio de PCR. Para alcançar este objetivo uma série de concentrações (70 ng-7 fg) do DNA foi testada. Esta abordagem foi necessária para se determinar a menor concentração de DNA capaz de ser amplificada, diminuindo, assim, ao máximo, a possibilidade de amplificação de DNA contaminante, onde os primers universais poderiam ligar, na amostra examinada. Determinou-se, então, que o limite de detecção, foi de 7fg.

4.2.3.2. Identificação das amostras por sequenciamento do DNA de *Eimeria caviae* procedente de *Cavia porcellus* de uma criação rústica.

Os produtos da reação (PCR) foram analisados num analisador Prism DNA 3700 automático (ABI Corp). Alinhamentos de sequência foram executados utilizando Sequencher (versão 4.10.1, Genecodes Corporation, CA, EUA). Todas as sequências foram inseridas no algoritmo de busca BLAST e o banco de dados NCBI para determinação da identidade genética. O DNA amplificado foi sequenciado utilizando os mesmos iniciadores empregados no ensaio de PCR, e as sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Sequencher 5.0. Para determinar o tamanho da região ITS1 dentro do amplicon, as sequências correspondentes aos genes que codificam o rRNA 18S e rRNA 5.8S de *Eimeria tenella* (número de acesso GenBank: AF026388) foram alinhadas com a sequência amplificada a partir de *E. caviae*.

4.2.4. Análises morfométricas

As medidas de tendência central para os diâmetros maior e menor, índice morfométrico e suas respectivas frequências e os testes descritivos, foram feitos com base em Pereira et al. (2001) e Sampaio (2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Eimeria caviae*

5.1.1. Identificação fenotípica dos oocistos esporulados

5.1.1.1. Morfologia

Os oocistos esporulados variaram de subesféricos a elipsoidais, com PO constituída por duas membranas. A PO de coloração marrom escura, sendo levemente rugosa na sua face externa, enquanto que a interna é mais fina e de coloração marrom claro, e lisa. CR: presente. Esporocisto elipsoidal ou levemente ovóide; CS: presente e de forma mamilar; CSS: ausente; RE: presente com poucos grânulos e agrupados na região mediana do esporocisto; CR e N presentes no esporozoíto (Figuras 7 e 8). As observações morfológicas encontradas neste trabalho se assemelham as descrições encontradas por Henry (1932), Lapage (1940), Zuart et al. (1961) quando suspeitaram que *E. caviae* e *E. dolichotis* fossem as mesmas espécies e Moore (1976). Entretanto, uma descrição detalhada do oocisto esporulado de *E. caviae* não foi feita por nenhum dos autores citados anteriormente.

5.1.1.2. Polimorfismo dos oocistos esporulados de *Eimeria caviae*

Apesar do polimorfismo acentuado, com oocistos, pequenos, médios e grandes (Tabela 2), onde houve diferença significativa entre os DMs dos oocistos esporulados, não houve alteração nas características morfológicas dos observados neste estudo, havendo, assim, concordância com as colocações de Lapage (1940), que afirmou ter observado uma forma pequena de oocistos, porém, sem considerá-lo como uma nova espécie. Além disso, as

mensurações dos oocistos esporulados observados neste trabalho foram compatíveis com as descrições feitas anteriormente (Tabela 3).

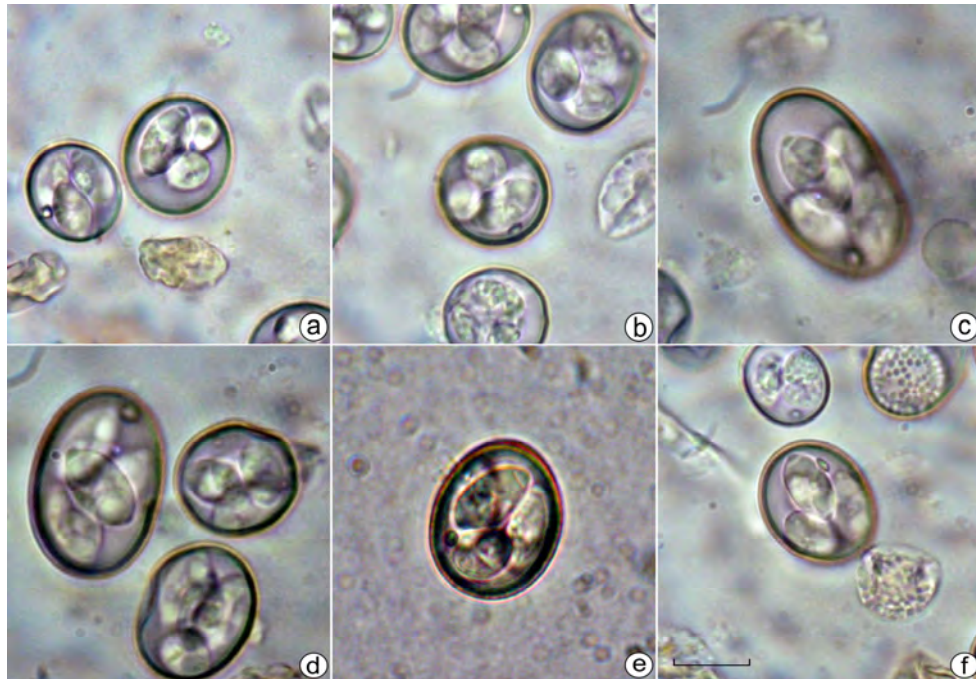


Figura 7. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Eimeria caviae*, recuperados a partir de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*): (a, b, d) sub-esférico, (c, d) elipsoidal, e (D, E, F) oocistos ovoidal. Os (d) três formas podem ser observadas no mesmo campo. Solução de açúcar Sheather. Escala: 10 μ m.

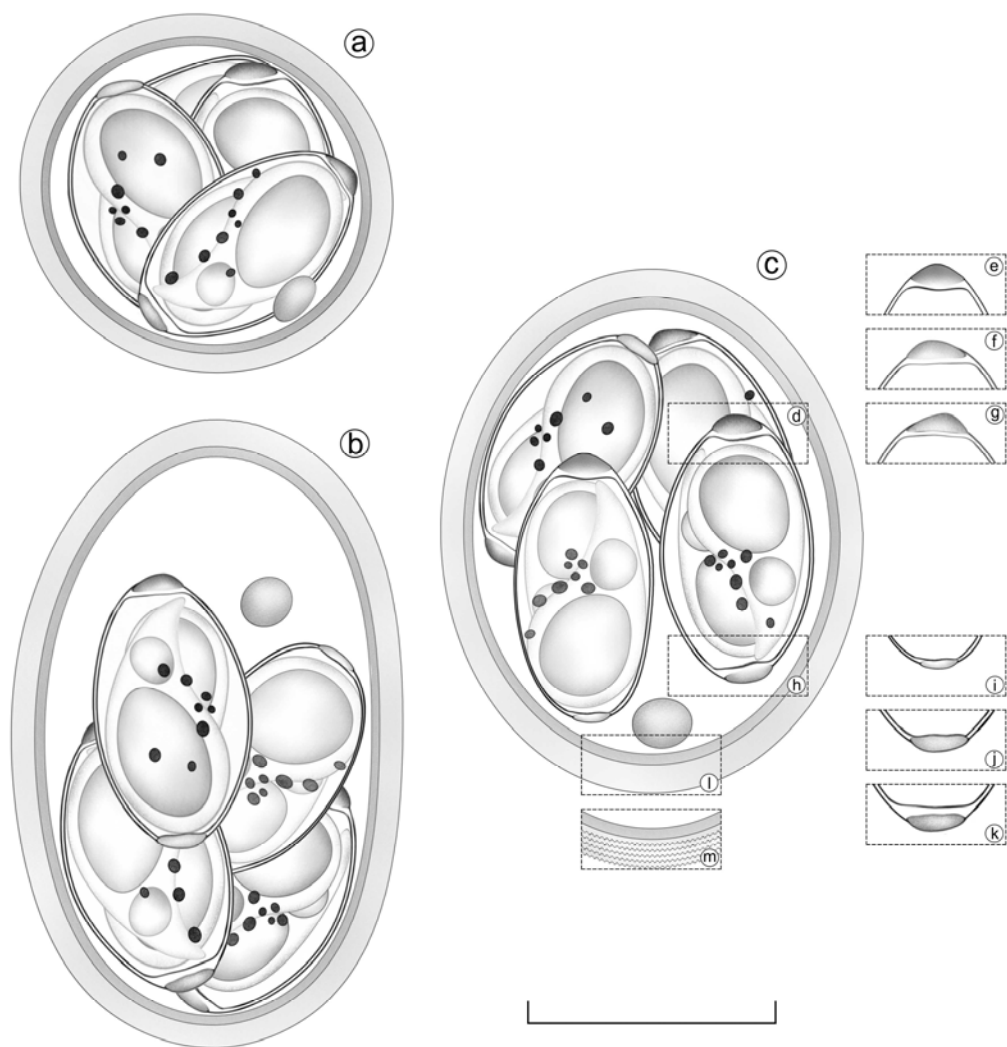


Figura 8. Desenho esquemático de um oocisto esporulado de *Eimeria caviae*. **(A) oocisto:** diâmetros, maior (DM) e menor (dm); parede do oocisto dividida em duas camadas (PO), membranas, externa rugosa (a) e lisa (b); Grânulo polar (GP); corpo refrátil (CR); núcleo (N). **(B) esporocisto:** diâmetros, maior (EM) e menor (em); corpos, de stieda (CS) e de substieda (CSS); resíduo do esporocisto (RE).

Tabela 2. Polimorfismo dos oocistos esporulados de *Eimeria caviae* procedentes de *Cavia porcellus* de uma criação rústica localizada em Seropédica, RJ.

Oocistos*	Oocistos (μm)		Índice Morfométrico	Esporocistos (μm)	
	Diâmetros			Diâmetros	
	maior	menor		maior	menor
Grande N=50	22,80a (24,9-22,2)	17,92ns (20,5-15,6)	1,27 (1,39-1,18)	11,09b (13,2-9,2)	6,55ns,b (9,0-5,1)
Médio N=50	20,87a (22,0-19,8)	17,87ns (19,8-16,1)	1,17 (1,32-1,07)	10,82 c,d (13,0-8,6)	6,38ns,d (8,6-4,8)
Pequeno N=50	18,07 ^a (19,8-14,3)	16,39ns (19,4-14,3)	1,10 (1,12-1,0)	9,76 b,e (13,4-8,6)	6,15c,e (7,3-4,2)

* Comparação das médias dos diâmetros maiores dos oocistos por coluna. Letras iguais $p \leq 0,001$; letras diferentes $p \leq 0,05$ (c,b) e letras diferentes $p \leq 0,01$ (d,e). Esporocistos Letras diferentes $p \leq 0,05$ (b, c); letras diferentes $p \leq 0,01$ (d,e). Não significativo (ns). N= número de oocistos mensurados.

Tabela 3. Comparação das características morfométricas dos oocistos esporulados de *Eimeria caviae* isolados de *Cavia porcellus*.

Autores	Oocistos					Esporocistos				
	Tamanho/Forma	Medidas (µm)	Índice morfométrico	Parede (µm)	Grânulo polar	Forma	Medidas (µm)	Corpo de Stieda	Substieda	Resíduo
Presente trabalho	Grande/elipsoidal	22,80 x 17,92	1,27	-	presente	Subesférica	11,09 x 6,55	presente	--	presente
Presente trabalho	Médio/elipsoidal	20,87 x 17,87	1,17	-	presente	Subesférica	10,82 x 6,38	presente	--	presente
Presente trabalho	Pequeno/subesférica	18,07 x 16,39	1,10	-	presente	Subesférica	9,76 x 6,15	presente	--	presente
Presente trabalho ^a	Subesférica/elipsoidal	20,58 x 17,39	1,18	-	presente	--	--	--	--	presente
Henry (1932)	--	24,6-15,9 x 17,4-12,2	--	-	--	--	--	presente	--	--
Ellis e Wright (1961)	--	18,0 x 15,0	--	-	--	--	--	presente	--	--
Lapage, (1940)	--	19,0 x 16,0 (25 -17 x 18 -13)	--	-	--	--	--	presente	--	--

Tabela 3. Comparação das características morfológicas dos oocistos esporulados de *Eimeria caviae* isolados de *Cavia porcellus* (continuação)

Autores	Oocistos					Esporocistos				
	Tamanho\Forma	Medidas (µm)	Índice morfológico	Parede (µm)	Grânulo polar	Forma	Medidas (µm)	Corpo de Stieda	Substieda	Resíduo
Zuart et al. (1961)	--	17 x 27 a 20,96 x 17,62	1,24	-	--	--	8,0-13,0 x 5,0 x 7,0	--	--	--
Moore (1976)	Elipsóidais	22,6 x 20,8 (19,9-25,9) x (17,2 x 24,3)	1,1	-	Presente	--	13,1 x 7,2	Presente	--	--
Muto et al.,(1985a)	Elipsóidais/subesféricos	20,0 x 17,0	--	-	--	--	--	--	--	--

^aCaracterísticas dos oocistos sem a separação de tamanho.

Estas características dos oocistos esporulados podem ser explicadas com base nos seguintes fatores: resistência e nutrição do hospedeiro, dose infectante e, provavelmente, o uso de coccidiostático na ração (FAYER, 1980; JOYNER, 1982); período de eliminação dos oocistos nas fezes durante o período patente (DUSZYNSKI, 1971; CATCHPOLE et al., 1975; JOYNER, 1982); e a característica de diferentes fenótipos frente a resposta ao parasitismo pelo hospedeiro vertebrado ou mesmo mudanças de ambiente (PARKER; DUSZYNSKI, 1986; GARDNER; DUSZYNSKI, 1990; BERTO et al., 2008a). Porém, independente do polimorfismo, a distribuição das medidas dos oocistos foi uniforme e seu IM (Figura 9a,b) e que, mesmo com as diferenças significativas entre os DMs dos oocistos esporulados de *E. caviae*, ainda se considera como uma só espécie, corroborando com as afirmações de Lapage (1940) por ter este observado oocistos de diferentes tamanhos nas fezes de cobaios, como já foi citado acima. Além dessas afirmações, observou-se neste trabalho, que o maior percentual durante o período de eliminação foi das formas consideradas de tamanho médio (Figura 10).

Após a obtenção dos coeficientes de regressão linear (R^2), onde os valores foram menores que 0,5 para esta avaliação, não se observou diferenças significativas sobre a distribuição quando foram comparadas as três formas de oocistos esporulados, quanto ao índice morfométrico (IM), neste trabalho. Metodologia semelhante foi usada para comparar oocistos esporulados de coccídios das aves por Norton e Joyner (1981), Joyner (1982) e Berto et al. (2008a); de *Isospora hemidactyli* de lagartixas por Berto et al. (2008b); em oocistos de *Hammondia heydorni* por Pereira et al. (2001) e de *C. felis*, por de Medeiros et al. (2007), variações estas observadas entre a utilização do camundongo como hospedeiro intermediário e infecção direta em felinos e com esporocistos de *Sarcocystis cruzi* procedentes de dois hospedeiros definitivos, como cachorro-do-mato e o cão doméstico (RODRIGUES et al., 2008). O que se observa é que isto pode ser mais frequente do que o esperado, sem, contudo diferenciá-las em mais de uma espécie. O valor de R^2 (0,38) mostrado na figura 9c e o fato da distribuição dos pontos no gráfico mostrar que muitos deles estão afastados da reta significa que o protozoário tem um acentuado polimorfismo.

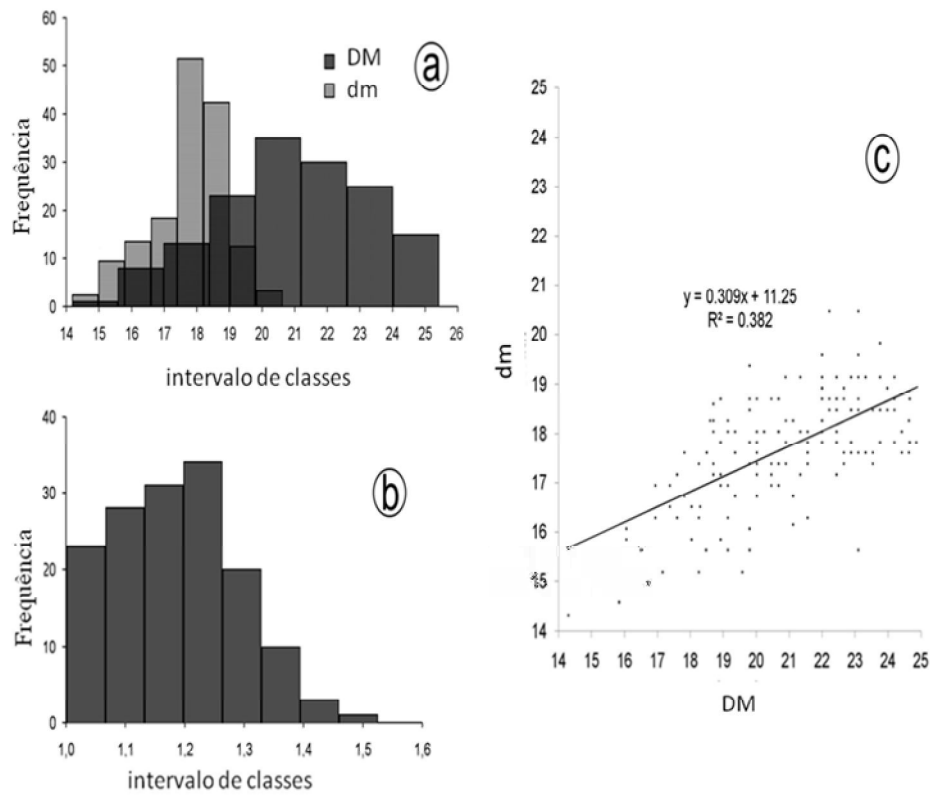


Figura 9. Histogramas de (a) DM e dm, IM (b) e R^2 (c) dos oocistos de *Eimeria caviae* procedente de Cobaias (*Cavia porcellus*) de criação rústica.

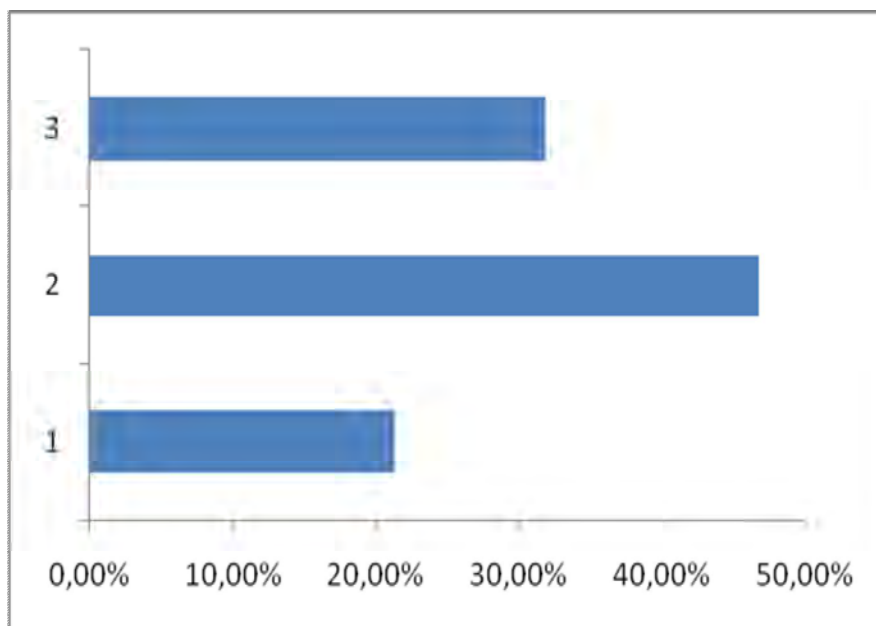


Figura 10. Percentual de oocistos esporulados por tamanho. (1) pequenos (2) médios e (3) grandes.

5.2. Biologia

5.2.1. Eliminação de oocistos

Os PPPs de *E. caviae* variaram de cinco a sete dias após infecção. Estes resultados foram semelhantes às observações de Moore (1976) para cepas atenuadas, consideradas como pouco patogênica, porém estes dados não foram considerados de maneira unânime pelos demais autores, conforme se observa na tabela 4. Já, o período patente de sete DAI foi observado em cobaios de criação rústica o que continua próximo aos dados de Moore (1976), independente de ser uma cepa atenuada ou não (Tabela 4).

Como se pode ver, pouca informação se tem até o presente momento, independente de ser uma cepa patogênica ou não.

Tabela 4. Variação dos períodos de eliminação de *Eimeria caviae* de cobaios.

Autores	Período ^a		Tempo de esporulação (dias)	Observações
	Pré-patente	Patente		
Matsui et. al, 1996	11-12 6	-- --	-- --	O menor PP, sucessivas passagens
Hijima et al, 1989	11 13	-- --	-- --	Infecção maciça, Óbito as 13 DAI Infecção leve
Moore (1976)	11-13 5-6	7-13 --	-- --	PP de passagens sucessivas
Sheater (1924)	--	--	4-8	
Henry, 1932	--	--	5-8	Segundo Bugge e Heinke (1923)
Soulsby (1987)	7-12	--	--	
Lapage (1940)	--	--	9-11	
Presente trabalho	5	6-7	4-7	Amostras de criações rústicas

^aDias após Infecção

5.2.2. Tempo de esporulação (TE).

A esporulação dos oocistos de *E. caviae* iniciou-se no 4º dia e durou 7 dias. Sua curva de eliminação está expressa na figura 11 e seu percentual de esporulação na figura 12, onde também há uma comparação deste com todas os DAIs. Analisando-o, vê-se que houve um maior percentual de esporulação nas amostras coletadas entre o segundo e o terceiro dia de eliminação, com o pico no segundo dia, onde o TE foi superior a 90%. Segundo Coudert et al. (1995) um bom tempo de esporulação seria de 80% dos oocistos esporulados para que haja uma boa resposta a infecção. Ao comparar os dados obtidos neste trabalho com dos outros autores (Tabela 4) observa-se que os dados obtidos para os oocistos eliminados por cobaios de criação rústica foram semelhantes aos das cepas consideradas como atenuadas.

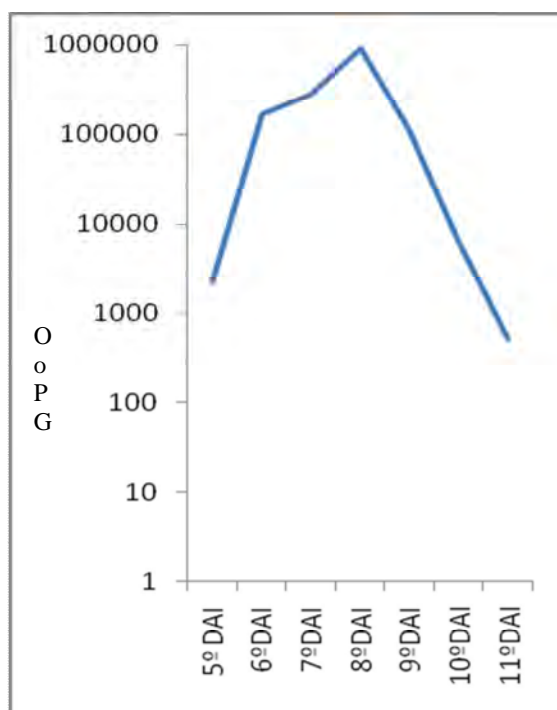


Figura 11. Eliminação média de oocistos *Eimeria caviae* por grama de fezes (OoPG) por *Cavia porcellus* infectados com 10^6 oocistos esporulados/ml.

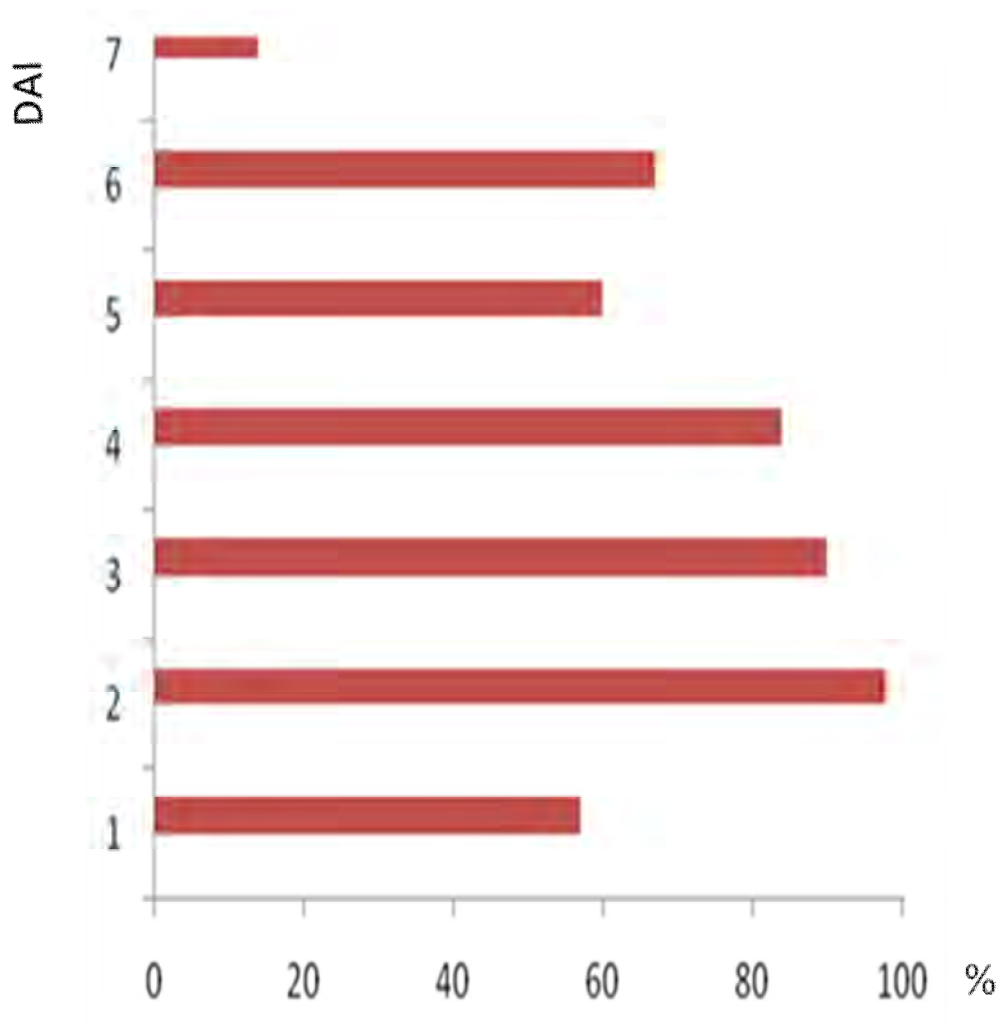


Figura 12. Taxa de esporulação de oocistos de *Eimeria caviae* eliminados por *Cavia porcellus* infectado experimentalmente com 10^6 oocistos esporulados *per os*, correspondente aos respectivos dias de eliminação.

5.2.3. Sintomas clínicos

Os animais infectados, tanto a linhagem albina de laboratório, quanto os cobaios de criação rústica, não apresentaram sintomas característicos de eimeriose com a dose empregada de 10^6 oocistos esporulados. Tal fato contraria os resultados

encontrados nas infecções por cepas de *E. caviae* por Sheater (1924); Lapage (1940); Wellis e Wright (1961); Moore (1976); Muto et al. (1985a); Soulsby (1987) e Matsui et al. (1996), este último utilizando a cepa selvagem. Entretanto, corroboram com os resultados encontrados por Matsui et al. (1996), quando utilizou a mesma cepa anteriormente usada, atenuada após várias passagens e Moore (1976), que também utilizou uma cepa de *E. caviae* atenuada por sucessivas passagens. Todos afirmaram que *E. caviae* infecta as células epiteliais da camada mucosa do ceco e do cólon e não do intestino delgado, local este, caso houvesse infecção, resultaria na síndrome da má absorção, caracterizada principalmente por perda no ganho de peso e no seu peso total final, o que não ocorreu neste trabalho, onde ambos os dados observados durante a fase de infecção não foram significativos quando se comparou o peso dos animais do grupo controle com os do grupo infectado com 10^6 oocistos esporulados de *E. caviae* por via oral (Tabela. 4). Não se observou nenhum sinal clínico da infecção, independente de ser a cepa utilizada neste trabalho isolada de criações rústicas e não de animais de laboratório. Em verdade, isoladas de porquinhos-da-índia em vez de cobaios albinos de laboratório. Fato exposto pensa-se estar diante de uma cepa semelhante as descrita como atenuada de *E. caviae*.

A cepa de *E. caviae* isolada não foi patogênica na dose infectante empregada de 10^6 oocistos esporulados, tendo-se em vista a não manifestação de sinais clínicos da doença e, conseqüentemente, a não interferência no desenvolvimento ponderal dos animais infectados em relação aos animais do grupo controle como se observa na tabela 5.

5.2.4. Isolamento, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do DNA.

Foram obtidos 700 ng de DNA da amostra de oocistos esporulados de *E. caviae* empregada. A amplificação utilizando 7fg de DNA como molde resultou na produção de um amplicon de aproximadamente 350 pb (Figura 13). Esta análise mostrou que a região ITS1 teve um tamanho de 232 nucleotídeos. Esta sequência não mostrou homologia significativa para qualquer sequência depositada no GenBank. A sequência do amplicon inteiro 352 bp foi depositada no GenBank com o número de acesso (KC484340).

Tabela 5. Desenvolvimento ponderal de cobaios de criação rústica desafiados com 10^6 oocistos esporulados de *Eimeria caviae* por via oral.

Dias após Infecção	Ganho de Peso médio (g) ^a n=5 ^b			Peso médio final (g) n=5		
	Controle	Infectado	Valor de <i>p</i>	Controle	Infectado	Valor de <i>p</i>
0	47,68±30,86	38,82±7,05	0,5489	417,50±70,11	415,36±69,35	0,9625
3	31,12±28,08	32,66±18,97	0,9216	434,06±69,56	426,44±82,09	0,8781
5	28,28±23,20	49,68±15,58	0,1252	439,15±71,54	415,42±78,73	0,6546
7	18,74±16,19	26,61±8,92	0,3657	446,44±56,58	432,40±87,27	0,7573
9	7,84±12,36	54,99±9,90	0,5256	457,34±58,42	446,48±76,99	0,8079
11	0,00	0,00	0,00	465,18±46,87	459,10±80,78	0,8879

^a Teste *t* de Student

^b Número de animais

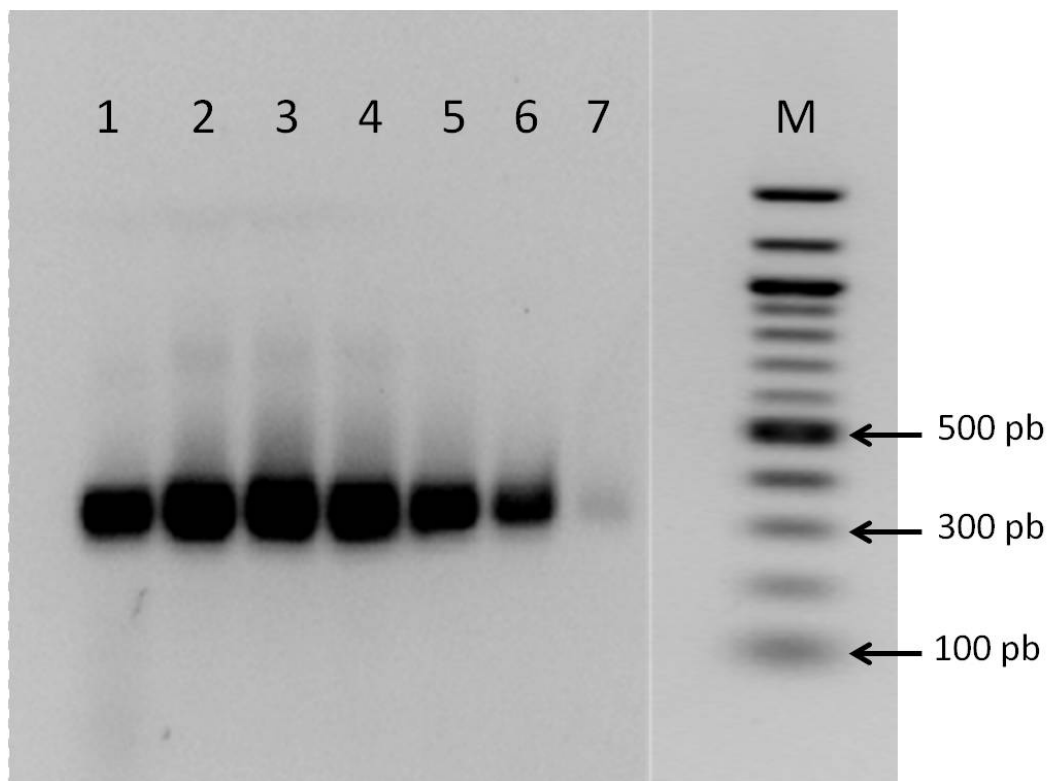


Figura 13. Determinação do limite de detecção do ensaio de PCR concebidos para a sequência de amplificação ITS-1 de *Eimeria caviae*. Coluna 1 = (7 ng de DNA), coluna 2 = (700 pg de DNA), coluna 3 = (70 pg de DNA), coluna 4 = (7 pg de DNA), coluna 5 = (700 fg do DNA), coluna 6 = (70 fg de DNA) coluna 7 = (7 fg de DNA). (M) marcador de 100 pb. Gel de agarose a um (1,5%). As posições dos marcadores representativos estão no lado direito desta figura.

5. PARTE 3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE AS FORMAS ENDÓGENAS DE *Cyniclomyces guttulatus* E *Eimeria caviae* PROCEDENTES DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*Cavia porcellus*)

5.1. REVISÃO DE LITERATURA

Muitas vezes o diagnóstico diferencial entre um ou mais agentes torna-se essencial para se determinar qual a etiologia responsável pela enfermidade, seja ela de origem infecciosa, nutricional ou a associação de ambas. A associação de fatores nutricionais a agentes infecciosos já foi assinalada previamente por Scrimshaw et al. (1959), onde afirmaram a existência dessa interação. Entre microorganismos, torna-se um fato de maior relevância, onde o diagnóstico diferencial é essencial para se determinar qual seria a responsabilidade de cada um em uma enfermidade. Dentro desta lógica, Costa et al. (2001) ao observarem lâminas de raspados de mucosa intestinal de coelhos corados pelo Giemsa, chamaram atenção da semelhança entre os zoítas e as células de *C. guttulatus*. Também em coelhos com coccidiose, Van Praag (2009) comentou sobre a dificuldade de separar as formas de um coccídio e células de *C. guttulatus*. Nesses dois artigos não assinalaram a real situação entre as fases que possam ser confundidas entre os dois organismos em surtos de coccidiose. Mais ainda, com o indicativo de ser este leveduriforme patogênico (FLAUSINO et al. 2012) torna-se importante determinar as possíveis diferenças entre as fases de ambos os organismos para que possa estabelecer o seu diagnóstico diferencial.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Animais utilizados no experimento

Para obtenção de *C. guttulatus* e de *E. Caviae* foram utilizados três porquinhos-da-índia procedentes de uma criação rústica localizada no município de Seropédica, RJ,

no intuito de serem doadores das formas endógenas a serem comparadas. Nas dependências do LCC, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), os animais foram mantidos em um infectório com ar refrigerado com água e ração da espécie *ad libitum*.

5.2.2. Infecção dos animais

Após aclimatação dos animais, em número de três, no infectório, exames de fezes foram feitos partindo das amostras coletadas individualmente dos animais, onde se observaram que os mesmos já eram portadores de *C. guttulatus* e negativos para *E. caviae*. Sendo assim, estes animais foram infectados com 10^6 oocistos esporulados de *E. caviae*, pela mesma metodologia aplicada anteriormente.

5.2.2. Necrópsia dos animais

Após a confirmação que os três animais iniciaram a eliminação de oocistos de *E. caviae* nas fezes, um dos animais foi escolhido aleatoriamente para ser eutanasiado com auxílio de uma câmara com inalação de CO₂ conforme procedimentos recomendados (COBEA, 2012). Confirmado o óbito, o animal foi colocado em decúbito dorsal e, a seguir, feita a incisão mento-pubiana com auxílio de um bisturi para expor a cavidade tóraco-abdominal para remoção do sistema digestivo. Para tanto, este sistema foi dividido em estômago, intestino delgado e intestino grosso. De cada segmento foram feitos raspados de mucosa com auxílio de uma lâmina de vidro para preparação de esfregaços. Estes esfregaços foram secos ao ar, desidratados em metanol por 5 minutos. Paralelamente a esta atividade fragmentos destes segmentos (estômago, intestino delgado e intestino grosso), após serem aderidos a um pedaço de papel poroso pela face da serosa, foram colocados em um frasco contendo formol histológico a 10% para fixação.

5.2.3. Análise laboratorial

5.2.3.1. Raspados de mucosa

Os esfregaços procedentes de cada segmento foram corados em Giemsa na relação de 3 gotas da solução de Giemsa para cada 1 ml de solução tampão pH 7,2 por um período de 30 minutos. A seguir, os esfregaços foram lavados em água corrente e secos ao ar ou em coloração de Ziehl-Nielsen (BEHMER et al., 1976). Para a identificação das formas endógenas de *C. guttulatus* e *E. caviae* foi utilizado um microscópio binocular marca Carl Zeiss (RFA) com auxílio das objetivas de 40 e 100X.

5.2.3.3. Fotografias

As fotomicrografias foram obtidas com auxílio de um microscópio binocular modelo Primo star, Zeiss (RFA) acoplado a uma câmara digital PANASONIC modelo LUMIX F2[®] (Japão).

5.2.3.4. Análise estatística

As medidas de tendência central para os diâmetros maior e menor, índice morfométrico e suas respectivas frequências e os testes descritivos, foram feitos com base em Pereira et al. (2001) e Sampaio (2002).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Aspectos comparativos das fases gastrintestinais de *Cyniclomyces guttulatus* e *Eimeria caviae*.

A dificuldade em avaliar as diferenças entre as formas endógenas de *E. caviae* e as de *C. guttulatus* torna-se mais acentuada quando se compara os merozoítas deste coccídio com as células vegetativas deste ascomiceto em conteúdo do trato gastrintestinal. Acentuado polimorfismo (Figura 14) pode ser observado em *C. guttulatus* quando se compara aos merozoítos de 1^a e 2^a geração de *E. caviae* em

esfregaços de intestino grosso de um porquinho-da-Índia com infecção natural de *C. guttulatus* e infectado experimentalmente com 10^6 oocistos esporulados de *E. caviae*. Isto se repetiu quando foram analisadas as diferenças morfométricas destas mesmas formas (Tabela 6). Casos anteriores a estes resultados não foram descritos, a não ser as colocações de Da Costa et al. (2001), ao infectar coelhos experimentalmente com *Cystoisospora felis*, onde assinalaram a semelhança que havia entre as células vegetativas vesiculadas de *C. guttulatus* e zoítas de coccídios encontrados na placa de Payer e Van Praag (2009), que chamou atenção da dificuldade que possa ocorrer entre as células vegetativas com vesículas e oocistos esporulados das espécies do gênero *Eimeria* em coelhos com coccidiose.

Tabela 6. Aspectos comparativos das formas livres de *Cyniclomyces guttulatus* e *Eimeria caviae* proveniente do intestino grosso de um porquinho-da-Índia.

Espécies	Formas ^a	Diâmetros (µm) ^b	
		Maior	Menor
<i>C. guttulatus</i>	<i>Células vegetativas grandes</i>	15,91 ^k (18,7-13,86)	4,22 ^y (7,92-5,50)
	<i>Células vegetativas pequenas</i>	10,89 ^w (14,08-9,24)	3,19 ^z (4,18-2,42)
<i>E. caviae</i>	Macromerozoítas	12,85 ^k (14,96-10,12)	3,10 ^y (3,96-2,42)
	Micromerozoítas	8,58 ^w (9,46-6,38)	2,51 ^z (2,86-1,98)

^a Número formas mensuradas =10

^b Letras iguais em cada coluna significante com $p < 0,001$ pelo test t de Student

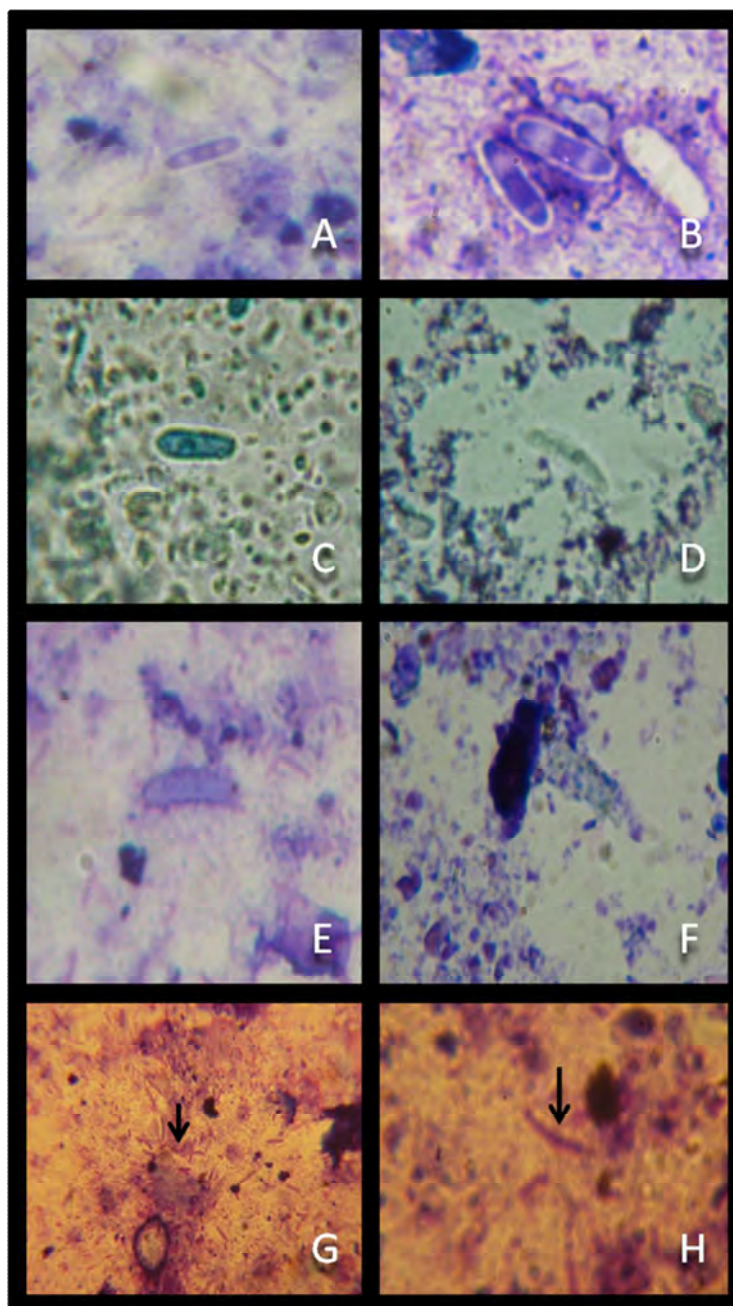


Figura 14. Aspectos comparativos entre as formas intestinais de *Cyniclomyces guttulatus*. Celulas vegetativas grandes (a) e pequenas (b) Giemsa.; (c) e (d) respectivamente. Ziel-Nielsen. *Eimeria caviae*. Macromerozoitas (e) e micromerozoítas (f) Gimsa; (g) e (h). respectivamente. Ziel-Nielsen. 1000X.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A criação de porquinhos-da-índia modificou-se desde as suas formas tradicionais em civilizações pré-colombianas, neste caso os incas, onde esses animais foram considerados de suma importância dentro de seus costumes. Hoje em dia, pode-se considerar que esses animais continuam a participar em nossa sociedade globalizada como animais de laboratório, de companhia ou mesmo ainda de criações rústicas, na maioria das vezes criadas nos fundos de quintais, determinando com isso o aparecimento de diversas variedades.

Sabe-se que dentre as doenças que acometem o porquinho-da-índia, as protozooses podem ser limitantes para sua criação tanto em um sistema controlado como em um rústico. Além disso, outros organismos podem ser encontrados em sua microbiota gastrointestinal, onde o seu desenvolvimento biológico pode inadvertidamente ser confundido com outras formas biológicas encontradas nesse microssistema. Sendo assim, a observação de células vegetativas, nas fezes desses animais, que se assemelham fenotipicamente a espécie *Cyniclomyces guttulatus*. Esse ascomiceto pode ser encontrado em diferentes espécies de animais domésticos com hábitos alimentares diferentes, chegando ao ponto de ser associado ao quadro clínico de enfermidades gástricas em cães. Concomitantemente a presença de *E. caviae* nas suas formas intestinais pode levar, em determinadas circunstâncias, a serem confundidas com as formas vegetativas do ascomiceto citado acima.

Este animal a ser considerado como animal de laboratório e, até o presente momento, portador de uma só espécie do gênero *Eimeria* facilita também determinar o diagnóstico diferencial entre os dois agentes etiológicos da microbiota intestinal de *Cavia porcellus*.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. *Cyniclomyces guttulatus* pode ser encontrado no trato digestório e nas fezes de *C. porcellus* como participante de sua microbiota sem causar lesões dignas de nota;
2. Os isolados de *C. guttulatus* de cobaios possuem características fenotípica e genotípica idênticas aos isolados desta espécie encontrados em coelhos;
3. A cepa de *E. caviae* isolada de cobaios de criações rústicas tem como morfotipos três tipos de oocistos esporulados, pequenos, medindo em média (18,07 x 16,39 μm), médios, medindo em média (20,87 x 17,87 μm) e grandes, medindo em média (22,80 x 17,92 μm), onde o polimorfismo pode ser observado através dos intervalos de classes nos histogramas e de sua reta de regressão. Apesar dos valores de DM serem significativos a morfologia dos oocistos esporulados não foram diferentes.
4. Em relação a morfologia, constatou-se a presença de corpo de parestieda na cepa de *E. caviae* isolada neste trabalho, o que não é comum nos coccídios deste gênero.
5. Os períodos pré-patente e patente foram de cinco e sete dias, respectivamente, caracterizando a espécie como de período curto;
6. Em infecção experimental, na dose empregada, *E. caviae* não causou eimeriose, pois não houve desenvolvimento de sinais clínicos nos animais e;
7. As formas endógenas de *C. guttulatus* e de *E. caviae*, caracterizadas como células vacuoladas pequenas e merozoítos respectivamente, são as que devem ser analisadas criteriosamente para que não haja equívoco no diagnóstico diferencial entre os dois agentes etiológicos em um mesmo hospedeiro vertebrado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, L. C.; BORGES, C. C. A.; DA SILVA, S.; COUTO, S. E. R.; MENEZES, R. C. Endoparasitos em cobaias (*Cavia porcellus*) (Mammalia, Rodentia, Caviidae) provenientes de biotérios de criação e experimentação do município do Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 5, p. 1380-1386, 2007.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, L. S. *Animais de Laboratório – Criação e Experimentação*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. 388p.

ANÔNIMO, Hefepilz heim Nagetierdem chinchilla, 2000. Disponível em: <<http://www.sg-net-2000.de/chinchilla/Hefepilz/index.html>>. Acessado em: 4 set. 2009.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart, 1976. 256p.

BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; ALMEIDA, C.R.R.; LOPES, C.W.G. Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 conditioned in two distinct sites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 30, n. 4, p. 207-211, 2008a.

BERTO, B.P.; LOPES, B. do B.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA-FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Contribution on the study of *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 and a report of an adeleid pseudoparasite of the house gecko *Hemidactylus mabouia*, from the Rio de Janeiro Metropolitan Region, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 3, p.150-154, 2008b.

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.

BRYCESON, A.D.M.; BRAY, R.S.; WOLSTENCROFT, R.A.; DUMONDE, D.C. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. *Clinical and Experimental Immunology*, v.7, n. 3, p. 301-341, 1970.

BUECHER, E.J.; PHAFF, H.J. Dimorphism in a new isolate of *Saccharomycopsis schionning*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 18, n. 6, p. 901-907, 1972.

BUECHER, E.J.; PHAFF, H.J. Growth of *Saccharomycopsis* Schönning under continuous gassing. *Journal of Bacteriology*, v. 104, n.1, p. 133-137, 1970.

BUGGE, G.; HEINKE, P. Über das Yorkommon Von Coccidien beim Meerschweinchen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 29, p. 41-42, 1921.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Canadian Council on Animal Care annual report 2004-2005*. Capturado em 26 jul. 2006. Online. Disponível na Internet: http://www.ccac.ca/en/Publications/PUBLICAT/Annualre/ccac_ar_2004-2005_en.pdf.

CARVALHEIRA, L.R.; VASCONCELOS, T.C.B.; LONGA, C.S.; ALBUQUERQUE M.C.; BRUNO, S.F. Má oclusão em cobaio (*Cavia porcellus*): Relato de caso. Disponível em: <http://uff.br/biodiversidade/images/stories/arquivos/Artigos_Moacyr/cobaio-chomp.pdf>. Acesso em: 7 mai. 2012.

CATCHPOLE J., NORTON C.C. & JOYNER L.P.. The occurrence of *Eimeria weybridgensis* and other species of coccidia in lambs in England and Wales. *British Veterinary Journal*, v.131, n. 4, p. 392-401. 1975.

CAVALCANTI, J. N.; GUERRA L. L.; GAMBALE W.; CORRÊA, B.; PAULA; C.R. Aspectos histopatológicos e micológicos da infecção experimental de cobaias com *Microsporium canis*. *Brazilian Journal of Veterinary Reserch and Animal Science*, v. 39, n.5, p. 238-243, 2002.

COBEA, Legislação & Ética. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/ceua/COBEA.htm>> . Acesso em: 25 set. 2012.

CORLISS, J.O. Na interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta of Protozoology*, v. 33, n.1, p. 1-51, 1994.

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.

COUDERT, P.; LICOIS, D.; DROUET-VIARD, F. *Eimeria* species and strains of rabbits. In: ECKERT, J.; BRAUN, R.; SHIRLEY, M.W.; COUDERT, P. *Guidelines on techniques in coccidiosis research*. Luxemburgo: Office for Official Publications of the European Communities, 1995. p. 53-73.

- COUTINHO, S. D. L.; DE CARVALHO, V. M.; DA COSTA, E. O. Surto de dermatomicose em cobaias por *Trichophyton mentagrophytes* e *Scopulariopsis brevicaulis*. *Clínica Veterinária*, v. 6, n. 31, p. 30-32, 2001.
- COX, F.E.G. A new classification of the parasitic protozoa. *Protozoological Abstract*, v. 5, n. 1, p. 9-14, 1981.
- 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.
- DUBEY, J. P. Life cycle of *Isospora rivolta* (Grassi, 1879) in cats and mice. *Journal of Parasitology*, v. 26, n. 3, p. 433-443, 1979.
- DUSZYNSKI, D. W. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *Journal of Parasitology*, v. 57, n. 5, p. 948-952, 1971.
- DUSZYNSKI, D.W.; UPTON, S.J.; COUCH, L. The Coccidia of the World. Disponível em: <<http://biology.unm.edu/biology/coccidia/table.html>>. Acesso: 14 dez 2011.
- DUSZYNSKI, D.W.; WILBER, P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.
- FLAUSINO, G. *Isolamento de Cyniclomyces guttulatus (Robin van der Walt & Soct (1971) no Brasil: estudo de meios para obtenção e manutenção*. 2005. 45f. Dissertação (Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- 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.
- GARDNER, S.L.; DUSZYNSKI, D.W. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *Journal of Parasitology*, v. 76, n. 6, p. 805-811, 1990.

- 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.
- HENRY, D. P. Coccidiosis of the guinea pigs. University California Publications in zoology, v. 37, n° 9, p. 211-268, 1932.
- HOWERS, D.J.; BLANKENSTEIN, B. *Cyniclomyces guttulatus* (Brillendoosjesgist) en diarree bij honden. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, v. 126, n. 6; p. 502, 2001.
- IJIMA, T.; MATSUI, T.; MORII, T.; KOBAYASHI, F.; FUJINO, T. Effects of sulfadimethoxine and sulfamonomethoxine against *Eimeria caviae* infection in guinea pigs. *Japanese Journal of Parasitology*, v. 38, n°3 , p. 129-134, 1989.
- JOYNER, L. O. Host and Site specificity, In: LONG P. L. *The biology of the Coccidia* Baltimore: University Park Press, p.35-62, 1982.
- KAWAHARA, F.; ZHANG, G.; MINGALA, C. N. ; T., YU; KOIWA, M.; ONUMA, M.; NUNOYA, T. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. *Veterinary Parasitology*, v. 174, n. 1-2, p. 49-57, 2010.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F; MINTER, D.W.; STALPERS, J. A. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi*. 10^a Ed. Wallingford: CABI. 2008. 746p.
- KLEEBERG, H. H.; STEENKEN JR., W. Severe coccidiosis in guinea pigs. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, v. 34, n. 1 , p. 49-52, 1963.
- KRAEMER, A.; HEIN, J.; HEUSINGER, A.; MUELLER, R. S. Clinical signs, therapy and zoonotic risk of pet guinea pigs with dermatophytosis. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. 2012. [doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02228.x]
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amesterdam: Elsevier Science B.V., 1998. 1035p.
- 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, 1999.
- LAPAGE, G. The Study of Coccidiosis (*Eimeria caviae* [Sheather 1924]) in the Guinea Pig. Part I & Part II. *Veterinary Journal*, v. 96, p. 144-154; 190-202; 242-254; 280-295; 1940.
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFIELD, E. G.; PAGE,

F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology*, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

MATSUI, T.; FUGINO T.; KOBAYASHI, F.; TSUTSUI, Y.; TSUJI M. Attenuation of *Eimeria caviae* by selection for precocious development. *International Journal for Parasitology*, v. 26, n. 11, p. 1242-1248, 1996.

MEDEIROS, S.M. de; LOSS, Z.G.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Pleomorfismo de oocistos de *Cystoisospora felis* (Wenyon, 1923) Frenkel, 1977 (Apicomplexa: Cystoisosporinae) induzido por diferentes fontes de infecção. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 14, n. 3, p. 163-166, 2007.

MENEZES R. C.A.A.; LOPES C.W.G. Epizootiologia da *Eimeria arloingi* em caprinos na microrregião serrana-fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Universidade Rural, Serie Ciências da Vida*, v. 17, n. 12, p. 5-12, 1995.

MOORE, C. B. . *A cytological study of the sporozoites of Eimeria caviae, a coccidian parasite of the domestic guinea pig, cavia porcellus*. 1976. 56 f. Thesis. Drake University, School of Graduate Studies. United State.

MOTTA, J. G.; PAULA, L. A. Epizootia por *Trichophyton mentagrophytes* em *Cavia cobaia*. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, v. 13, n. 1, p. 53-56, 1974.

MUTO, T.; SUGISAKI, M.; YUSA, T.; NOGUCHI, Y. Studies on coccidiosis in Guinea pigs 1. Clinico-pathological observation. *Experimental Animal*, v. 34, n.1, p. 23-30, 1985a.

MUTO, T.; YUSA, T.; SUGISAKI, M.; TANAKA, K.; NOGUCHI, Y.; TAGUCHI, K. Studies on coccidiosis in Guinea pigs 2. Epizootiological survey. *Experimental Animal*, v. 34, n. 1, p. 31-39, 1985b.

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

ODENING K. The present state of espécies-systematics in *Sarcocystis* Lankaster, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Systematic Parasitology*, v. 41, n. 3, p. 209-233, 1998.

OLIVEIRA U. C.; FRAGA J. S.; DOMINIQUE L.; PAKANDLC, M.; GRUBER, A. Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Parasitology*, v. 176, n 2-3 , 275-280, 2011.

PARKER, B.B.; DUSZYNSKI, D.W. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *Journal of Parasitology*, v. 72, n. 4, p. 602-604, 1986.

- PARLE, J.N. The growth of *Saccharomyces guttulata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 22, n. 3, p. 237-242, 1956.
- PEREIRA, M.J.S.; FONSECA, A.H.; LOPES, C.W.G. Regressão linear na caracterização de variações morfométricas em coccidia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 10, n. 2, p. 75-78, 2001.
- PETERS, S.; HOWERS, D.J. Een geval diarree geassocieerd met *Cyniclomyces guttulatus* (brillendoosjesgist) bij de kat. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, v. 134, n. 5, p. 198-199, 2009.
- PFLAUM, J. Animal Hospitals. Guinea Pig Diseases/General. Disponível em: <<http://www.animalhospitals-usa.com/small-pets/guinea-pigs/guinea-pig-diseases/guinea-pig-diseasesgeneral.html>>. Acessado em: 7 mai. 2012.
- 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^a ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1971. p. 125-129.
- RICHE, R.; SCHOLER, H.J. *Saccharomyces guttulata* Von kaninchen: kulturelle eigenschaften und mögliche bedeatung. *Pathologie und Microbiologie*, v. 24, n.5, p. 783-793, 1961.
- RIGBY, C. Natural infections of guinea-pigs. *Laboratory Animal*, v.10, n. 2, p. 119-142, 1976.
- RODRIGUES, J.S.; MEIRELES, G.S.; CARVALHO FILHO, P.R.; RIBEIRO, C.T.; FLAUSINO, W. ; LOPES, C.W.G. *Sarcocystis cruzi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) no cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 11, p. 561-564, 2008.
- 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, p. 153-196, 1984. Disponível em: < <http://www33.ocn.ne.jp/~saitoahohp/Cyniclomyces.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2012.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3a.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 274p

- SCHOEB, T.R. Diseases of Guinea Pigs. Disponível em: <<http://netvet.wustl.edu/species/guinea/gpigs.txt>>. Acessado em: 11 ago. 2012.
- SCRIMSHAW, N.S.; TAYLOR, C.E.; GORDON, J.E. Interactions of nutrition and infection. *American Journal of Medical Science*, v. 237, n. 3, p. 367-403, 1959.
- SHEATHER, A.L. Coccidiosis in the guinea-pig. *Journal of Comparative Pathology and Therapy*, v. 37, p. 243-246, 1924.
- SHIFRINE, M.; PHAFF, H.J. Nutritional requirements of *Saccharomycopsis guttulata* (Robin) Schönning. *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.
- SOULSBY, E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias em los animales domésticos*. 7^a Ed. México: Interamericana, 1987. 823p.
- TENTER, A.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, R. C. A.; CONRAD, P. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 4, p. 505-616, 2002.
- TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene*, v. 10, n. 2, p. 269-283, 1929.
- UPTON, S.J. Subordem Eimeriorina Léger, 1911. In: LEE, J.J.; LEEDALE, G.F.; BRANDBURY, P. *An illustrated guide to Protozoa*. 2^a ed., London: Society of Protozoologists, 2000. p. 318-339.
- VALIM M.P.; AMORIM M.; SERRA-FREIRE, N.M. Parasitismo por Acari e Phthiraptera em cobaios [*Cavia Porcellus* (Linnaeus, 1758)] de ambientes rural e urbano nos municípios de Silva Jardim e Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, n. 4, p. 240-246, 2004.
- VAN DER WALT, J.P.; SCOTT, D.B. The yeast genus *Saccharomycopsis* schönning. *Mycopathology and Mycology Applied*, v. 43, n. 3-4, p. 279-288, 1971.
- VAN PRAAG, E. Enterits protozoal: coccidiosis. Disponível em: <http://www.medirabbit.com/EN/GI_diseases/Protozoal_diseases/Cocc_en.htm>. Acesso em: Set 2009.
- WELLIS, P.A.; WRIGHT, A.E. Coccidiosis in guinea-pigs. *Journal of Clinical Pathology*, v. 14, n. 4, p. 394-396, 1961.

WIKIPEDIA. Porquinho-da-índia. Disponível em: <<http://www.wikipedia.org/wiki/>>. Acesso em: 24 mai. 2012.

WILLIAMS, C. S. F. *Practical guide to Laboratory animals*. 1ª ed. Saint Louis: C. V. Mosby Co., 1976. 207p.

WILLIAMS, C. S. F. *Practical Guide to Laboratory Animals*. Saint Louis, 1976. Ed. The C. V. Mosby Company.

WOODS, C.A.; KILPATRICK, C.W. Infraorder Hystricognathi Brandt, 1855. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, 2005. p. 1538-1600.

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.

ZWART, P.; STRIK, W. J. Further observations on *Eimeria dolichotis*, a coccidium of the Patagonian, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 58–59, 1961.

9. ANEXOS

Anexo 1. 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.

Isolation and Characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in Dogs in Brazil

Gilberto Flausino · Paulo D. S. Leal · Douglas McIntosh ·
Luciana G. Amaral · Walter L. Teixeira Filho ·
Walter Flausino · Carlos W. G. Lopes

Received: 27 April 2012 / Accepted: 19 June 2012 / Published online: 21 July 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Vegetative cells of an ascomycetous yeast, morphologically consistent with published descriptions of *Cyniclomyces guttulatus*, were observed in large numbers in the feces and stomach washes of three dogs with a recurrent medical history characterized by vomiting and diarrhea. Nucleotide sequence analysis of an approximately 600 base pair fragment of the variable D1/D2 domain of large subunit (26S) ribosomal DNA of a pure culture, isolated from a Siberian Husky, revealed 98–99 % homology to sequences deposited in the GenBank as *C. guttulatus*. These data represent the first observation of *C. guttulatus* in association with canine gastrointestinal illness in the southern hemisphere and add weight to the hypothesis that this yeast may act as an opportunistic pathogen of dogs. An extended examination of wet mounts and smears prepared from feces collected from 63 dogs with no clinical symptoms of gastrointestinal illness, identified *C. guttulatus* in 14 (22.2 %) of the animals, albeit at lower numbers than in diseased dogs, indicating that this yeast species is widely distributed as a component of the normal microflora of the canine gastrointestinal tract.

Introduction

Gastrointestinal disorders, characterized by the clinical signs of vomiting and diarrhea, comprise a large portion of the cases encountered in small animal clinics [19]. Vomiting is the main clinical sign of stomach illnesses, while diarrhea reflects a disturbance in the function of the small or large intestine [7]. Bacterial, viral, and parasitic infections account for most cases of diarrhea, while non-infectious causes of diarrhea include drugs, surgical conditions, systemic infections and food intolerance [7]. In infectious disease, changes in diet often play an important role via the induction of an imbalance of the intestinal microbiota [19]. Diarrhea in dogs and cats can vary from a discrete, short lived event through to severe clinical manifestations which may lead to death. Cases of diarrhea may be classified as either acute or chronic. In acute cases clinical signs are often of sudden onset and generally persist for a few days, with stool consistency being aqueous to aqueous-mucoid, although in severe cases it may be bloody. In contrast, chronic cases can extend over weeks or months and may demonstrate a pattern of periodic recurrences, with the animals going through alternating periods of improvement and worsening of the condition [7, 19].

The majority of yeast species associated with dogs are considered to represent commensal organisms, with *Candida* spp., *Malassezia pachydermatis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula* spp. forming part of the normal canine microbiota at multiple anatomical sites [3]. Nevertheless, members of these genera have also been reported as the etiologic agents of localized and systemic infections in humans and various animals, including dogs, most often as a consequence of disturbances to physicochemical or immunological defense barriers of the host [4, 5]. Reports of yeast associated diarrhea in dogs, or in any other animal,

G. Flausino · P. D. S. Leal · D. McIntosh ·
L. G. Amaral · W. L. Teixeira Filho · W. Flausino ·
C. W. G. Lopes
Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro,
Seropédica, Brazil

P. D. S. Leal · L. G. Amaral · C. W. G. Lopes (✉)
Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária,
Barra da Tijuca, Brazil
e-mail: lopesw@ufrrj.br

are scarce. However, the ascomycete *Cyniclomyces guttulatus* (formerly *Saccharomycopsis guttulata*), which occurs naturally in the digestive tract of rabbits, guinea pigs, chinchillas, rats and mice [21], has been linked with cases of diarrhea in rabbits in Switzerland [16] and in the United States [10]. Moreover, the presence of this yeast in massive numbers in the feces of both cats and dogs with diarrhea was reported by Dutch researchers [11, 14]; in a dog with recurrent gastroenteritis in Norway [9], and it was associated with a case of hemorrhagic diarrhea in a Labrador Retriever in Japan [18]. In addition, *C. guttulatus* was reported as causing secondary gastrointestinal infections in Rottweilers with protein losing enteropathy in Holland [6] and was observed, as an apparent incidental finding, in the bile and feces of a Labrador Retriever diagnosed with emphysematous cholecystitis in the USA [13].

The current study reports the characterization, using morphological and molecular methods, of *C. guttulatus* from stomach washes and feces of three dogs with recurrent gastrointestinal disturbances and the detection of this yeast in the feces of an additional 14 dogs with no clinical symptoms of gastrointestinal illness.

Materials and methods

Study Population and Clinical Examinations

The study population comprised 66 dogs attended between June 30th 2011 and February 14th 2012, at an intensive care unit and emergency veterinary clinic located in Barra da Tijuca, municipality of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Sixty-three of the animals (39 Golden Retrievers and 24 German Shepherds), were undergoing annual health checks and did not display symptoms of any gastrointestinal disorder. In contrast, the remaining three dogs (a Rottweiler, a Siberian Husky and a Shih Tzu) each presented a recurrent medical history characterized by vomiting and diarrhea, with occasional blood in the diarrhea. Ultrasonographic imaging was performed to confirm gastroenteritis in dogs with clinical signs. Stool samples collected from the 66 dogs were examined microscopically for the presence of ascomycetes. In addition, gastric lavage based on the introduction and recovery of 60 mL of 0.8 % saline, via a 8 mm nasal gastric probe and syringe, was performed on the three animals exhibiting symptoms of gastroenteritis. Pre-anesthesia medication comprised morphine sulphate (0.5 mg/Kg) in combination with acepromazine (0.01 mg/Kg), administered intramuscularly. Induction of anesthesia was performed with propofol (4 mg/Kg) administered intravenously to permit orotracheal intubation. Anesthesia was maintained using isothane at a concentration of 1.6 %, which corresponded to a value of approximately 1.0 of the

minimum alveolar concentration (MAC), with oxygen flow at 100 %.

Microscopic Examination of Stool and Stomach Wash Samples

The technique of saturated sucrose centrifugal flotation [2], was applied to the stool samples of all animals to separate yeast cells from the denser fecal material. Wet mounts were prepared by applying a coverslip to the top of the flotation solution meniscus, the collected material was mounted and stained on a slide with Amann lactophenol cotton blue [17], and examined microscopically (magnification 400×, bright field) for the presence of ascomycete vegetative cells. The same procedure was applied to samples of freshly collected stomach wash. In addition, smears prepared from feces and stomach washes were dehydrated in methanol, stained with Giemsa and observed at 400× magnification.

Isolation of Yeasts from Stomach Washes

Syringes containing the stomach washes were transported to the laboratory in coolers, within 2 h of collection. Isolation of yeast from the gastric lavage samples employed the methods of Phaff and Miller [15], as modified by Flausino and Baroni [8]. Briefly, 1 mL of each sample of stomach wash was used to inoculate 50 mL of Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) broth (Difco; pH 3.0) supplemented with ampicillin 3 mg/mL, in individual 125 mL Erlenmeyer flasks, with static incubation at 37 °C for 24–48 h. Cultures were subcultured twice by passaging aliquots (1.0 mL) into flasks containing 50 mL of fresh growth medium, with incubation as described above. Thereafter, duplicate aliquots (0.1 mL) were used as inocula for plates of YPG agar (pH 7.0 ± 0.2), supplemented with bromothymol blue (0.01 g L⁻¹), with incubation at 37 °C for 24–48 h under conditions of low O₂ and high (10–20 %) CO₂ concentration in combination with elevated humidity. Culture conditions were generated and maintained by combustion, using a paraffin candle (within a hermetically sealed glass candle jar), in combination with a sodium bicarbonate, CO₂ generating tablet (ISOFAR, Duque de Caxias, Brazil), dissolved in a beaker containing 100 mL of distilled water. Following incubation, plates were examined using an inverted binocular microscope (Opton®; model TNB-05-T-TL) to determine the growth of colonies with characteristics previously described for *C. guttulatus* [8, 15]. Individual colonies were subcultured into liquid and onto solid YPG media to obtain pure cultures for subsequent morphological and molecular analyses. In order to perform comparative analyses, working cultures of a yeast recovered from rabbit feces and

previously identified biochemically as *C. guttulatus* [8], were prepared from frozen stocks with incubation in YPG broth and agar as described above.

DNA Isolation

A single isolated colony of each isolate (Husky and rabbit), was re-suspended in duplicate in 250 μ L of ice cold phosphate buffered saline (pH 7.2), in screw capped 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 50 mg of glass beads (Sigma-Aldrich; product # G8772). Tubes were placed in a mini-beadbeater-16 apparatus (Biospec; Bartlesville, OK, USA), and the cells were disrupted using a single cycle of agitation (60 s). Cell lysis was completed by the addition of 250 μ L of cell disruption solution (20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1 % sodium dodecyl sulphate), with lysates incubated for 15 min at 56 °C. DNA was extracted by single rounds of phenol and phenol chloroform treatment, followed by precipitation with an equal volume of isopropanol for 20 min at room temperature. Precipitated (16,000 \times g for 15 min) DNA pellets were desalted twice with 70 % ethanol and re-suspended overnight at 4 °C in 50 μ L of molecular biology grade water (Sigma-Aldrich), with subsequent storage at -20 °C.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA Sequencing

The primers, reaction components and cycling conditions described by Kurtzman and Robnett [12], were used to amplify an approximately 600 base pair fragment of the variable D1/D2 domain of large subunit (26S) ribosomal DNA. An aliquot (5 μ L) of each PCR reaction was examined by agarose gel electrophoresis to confirm the presence of the appropriate amplicon. Remaining PCR products were treated with Exo-Sap-IT (USB) according to the manufacturer's protocol and sequenced in both directions, using the amplification primers by use of the BigDye Ready Reaction mix (ABI Corp); reaction products were analyzed on a Prism 3700 automated DNA analyser (ABI Corp). Sequence alignments were performed using Sequencher (Version 4.10.1, Genecodes Corporation, CA). All sequences were entered into the BLAST search algorithm [1] and the NCBI nucleotide database to determine gene identity.

Results

Clinical Data

Among the 66 animals examined three presented a recurrent clinical history, characterized by vomiting and diarrhea, with

occasional episodes of bloody diarrhea. In the case of the Rottweiler, the presence of blood in the stools coincided with a change in diet supporting the observations of Sherding and Johnson [19]. In the case of the Shih Tzu, progressive weight loss was an additional symptom as previously observed by Gjerde et al. [9], in a case of recurrent gastroenteritis, associated with large numbers of *C. guttulatus* in the feces of a Siberian Husky in Norway. Examination of the animals using ultrasound imaging demonstrated distended intestinal walls with gas content and decreased echogenicity, as well as moderate to severe increases in the thickness of the mucosa suggestive of gastritis.

Microscopy and Culture Based Analysis of Material Collected from Dogs with Gastrointestinal Illness

Microscopic examination of both wet mounts (Fig. 1a) and smears (Fig. 1b), of the stomach washings and feces of each of the three animals revealed the presence of large numbers (>20 cells per field of view at 400 \times magnification, in stomach washes) of cylindrical ascomycetes consistent with published description of *C. guttulatus* [8, 15]. In addition the growth of long chains, resulting in the formation of pseudo-hyphae, was noted in the stomach wash, but not the feces of the Rottweiler (Fig. 1a, b). This morphological feature has only rarely been reported in vivo, specifically in canine fecal material [9, 11] and in gall bladder aspirate from a dog [13]. Colonies, cream to brown in color, which exhibited morphological features (smooth, butyrous) as described for *C. guttulatus* recovered from rabbit feces [8], were isolated in pure culture from the stomach wash of the Siberian Husky but pure cultures were not obtained from the stomach washes of the other two clinically ill dogs. In both cases, microscopic examination of the preliminary liquid cultures revealed the predominance of yeasts (primarily cells morphologically consistent with *C. guttulatus*), relative to bacteria. However, upon subculture, the yeast cells were rapidly overgrown by the bacteria.

Direct examination, using an inverted microscope, of individual colonies derived from the Siberian Husky showed the presence of cylindrical cells, with or without vacuoles, in chains with single (central), double (bilateral) or triple branches resulting in pseudo-filament formation at discrete locations along the colony edges. In contrast, this morphological feature was not observed in colonies produced by the *C. guttulatus* isolate recovered from rabbit feces in Brazil.

Molecular Analysis of Cultured Yeast

PCR amplification of DNA derived from individual colonies of the Siberian Husky isolate and from the rabbit culture previously identified biochemically as *C. guttulatus*

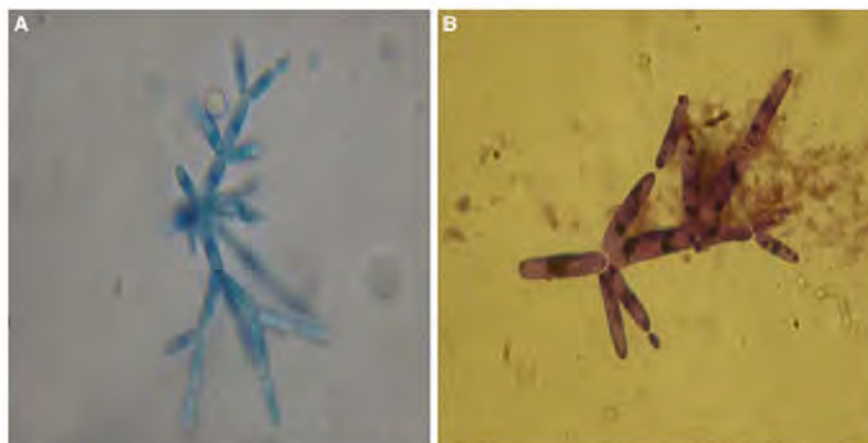


Fig. 1 Microscopic observation of *C. guttulatus* in stomach lavage of a Rottweiler. Fresh, wet mounted sample stained with Lactophenol cotton blue (a); methanol dehydrated smear stained with Giemsa (b). Magnification $400 \times 169 \times 86 \text{ mm}$ ($150 \times 150 \text{ DPI}$)

[8], generated amplicons of the expected mobility on agarose gels. Comparative sequence analysis of the Husky isolate amplicon (GenBank accession number JQ861266) revealed 99 % nucleotide sequence homology (8 nucleotide differences over 593 nucleotides), with the amplicon from the rabbit isolate NRRL/Y-17561 (Genbank accession number U76196); deposited by Kurtzman and Robnett [12]. In addition, it demonstrated 98 % sequence homology (8 nucleotide differences over 533 nucleotides), with the sequence amplified from a *C. guttulatus* isolate associated with diarrhea in dogs (Genbank accession number FJ755179), in Norway [9]. The molecular data confirmed the morphological findings and definitively identified the diarrhea associated ascomycetes as *C. guttulatus*. Submission of sequence data for the amplicon generated from the Brazilian rabbit isolate (GenBank accession number JQ861267), to the BLAST search algorithm [1], revealed 97 % homology (15 nucleotide differences over a total of 533 nucleotides) to the Norwegian dog isolate and a level of 96 % homology (24 nucleotide differences over a total of 592 nucleotides) with the U76196 sequence. Finally, a comparison between the amplicons generated for the Brazilian dog and rabbit isolates demonstrated a level of 96 % nucleotide homology (19 nucleotide differences over a total of 592).

Examination of Fecal Material Collected from Healthy Animals

Microscopic examination of feces (wet mounts and smears), collected from a total of 63 dogs undergoing routine health checks revealed the presence of yeast cells,

Table 1 Distribution of *C. guttulatus* in dog feces

Breed	Number examined	Vegetative cells		Clinical signs
		Positive (%)	Negative	
Golden Retriever	39	12 (37.7) ^a	27	Absent
German Shepherd	24	2 (8.3) ^a	22	Absent
Rottweiler	1	1 (100) ^b	0	Present
Siberian Husky	1	1 (100) ^b	0	Present
Shih Tzu	1	1 (100) ^b	0	Present
Total	66	17 (24.61)	49	

^a Detection based on microscopic examination of feces

^b Detection based on microscopic examination of feces and stomach washings

consistent with the description of *C. guttulatus*, in 37.7 % (12/39) of Golden Retrievers and in 8.3 % (2/24) of German Shepherds (Table 1). It should be noted that the levels of yeast cells recorded in wet mounts prepared from the feces of healthy dogs were much reduced (generally <2 cell per field of view at 400 \times magnification; when present), in comparison to the quantities observed in the evacuations of the three diseased animals.

Discussion

A possible association between large scale growth of *C. guttulatus* and gastrointestinal disturbance in dogs has previously been proposed by northern European and Japanese research groups [9, 11, 14, 18]. The results of the present study provided further support for the existence of

such an association, and represented the first confirmed isolation of *C. guttulatus* from dogs, with gastrointestinal illness, in the southern hemisphere. Molecular techniques i.e. PCR and nucleotide sequence analysis, were employed to validate the morphological findings and to permit a comparison between our canine isolate and other *C. guttulatus* sequences deposited in the GenBank. Interestingly, the observed levels of nucleotide polymorphisms in the approximately 600 bp region of domain D1/D2 of the sequences currently deposited in GenBank as *C. guttulatus* (where sequence U76196 was considered as the type strain), were substantially higher than the levels recorded for other species of ascomycetous yeast, where nucleotide sequence divergence between type strains and conspecific isolates was generally less than 3 nucleotides, although for some species it was as high as 6 nucleotide substitutions [12]. In light of the elevated levels of sequence polymorphisms, coupled with the subtle differences in morphological characteristics, it is worth considering the possibility that the genus *Cyniclomyces* may in fact comprise more than a single species as suggested previously by Gjerde et al. [9], where a total of 11 nucleotide substitutions (over 533 nucleotides) were recorded between the diarrhea associated isolate (FJ755179) and the NRRL/Y-17561 authenticated, rabbit derived, culture. Sequence analysis of additional regions of the genome e.g. the internal transcribed spacer (ITS) regions ITS1 and ITS2 and the intervening 5-8S rRNA gene as applied to other ascomycetes [20], will be required to resolve this taxonomic question.

As shown above, reports demonstrating a link between *C. guttulatus* and gastrointestinal disorders of dogs have steadily increased in frequency during the last decade. Nevertheless, to our knowledge, there have been no reports of this yeast species in association with healthy dogs. In the current study, microscopic examination of feces (wet mounts and smears), collected from a total of 63 healthy dogs revealed the presence of vegetative cells of *C. guttulatus* in 22 % (14 of 63) of the animals. Clearly, these data indicate that *C. guttulatus* comprises a component of the normal microflora of healthy dogs and implies that, as with the majority of yeast infections; the association between *C. guttulatus* and gastro-intestinal disturbances in dogs most likely reflects a breakdown in the innate defense mechanisms of the host [4, 5]. It is of interest that a recent, culture based, study of yeast species associated with a population of 203 healthy dogs in Brazil [3], did not identify *C. guttulatus* as a component of the microflora in a variety of anatomical sites i.e. preputial, vaginal, oral and perianal mucosae, however that is most likely explained by the fact that the culture media and incubation conditions employed in that study would not have favored the isolation of *C. guttulatus*.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Birgel EH, Netto LP, Amaral V et al (1977) Meios e métodos de diagnóstico em Medicina Veterinária, 4ª ed. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo
- Brito EH, Fontenelle RO, Brilhante RS et al (2009) The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *Vet J* 182:320–326
- Cafarchia C, Otranto D (2004) Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. *J Clin Microbiol* 142:4868–4869
- Coutinho SDA (2005) *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57:149–153
- Dijkstra M, Kraus JS, Bosje JT et al (2010) Protein-losing enteropathy in Rottweilers. *Tijdschr Diergeneeskd* 135:406–412
- Ertinger SJ (1996) Manual de medicina Interna Veterinária, 1ª ed. Editora Manole, São Paulo
- Flausino G, Baroni FA (2009) Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971). *Rev Bras Med Vet* 31:100–103
- Gjerde B, Holtet L, Sanden S et al (2009) *Cyniclomyces guttulatus*-lignende sopp som mulig årsak til gastroenteritt hos hund—en kasusbeskrivelse. *Norsk Veterinær Tidsskrift* 121:507–510
- Hersey-Benner C (2008) Diarrhea in a rabbit. *Cyniclomyces guttulatus* yeast. *Lab Animal (NY)* 37:347–349
- Houwers DJ, Blankenstein B (2001) *Cyniclomyces guttulatus* and diarrhea in dogs. *Tijdschr Diergeneeskd* 126:14–15
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 331–371
- Neel JA, Tarigo J, Grindem CB (2006) Gallbladder aspirate from a dog. *Vet Clin Path* 35:467–470
- Peters S, Houwers DJ (2009) Een geval van diarree geassocieerd met *Cyniclomyces guttulatus* (brillendoosjesgist) bij de kat. *Tijdschr Diergeneeskd* 134:198–199
- Phaff HJ, Miller MW (1999) *Cyniclomyces* Van Der Walt et Scott. In: Kurtz CP, Fell JW (eds) *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp 154–156
- Richle R, Scholer HJ (1961) *Saccharomycopsis guttulata* Von Kaninchen: Kulturelle Eigenschaften Und Mögliche Bedeutung. *Pathol et. Microbiol* 24:783–793
- Rippon JW (1974) *Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. W.B. Saunders Co, Philadelphia
- Saito K, Saito H, Watanabe T et al. (2009) *Cyniclomyces guttulatus*: it can now be clearly observed in canine feces. Saito Animal Hospital, M.B.Network, Kitasato Institute. <http://www33.ocn.ne.jp/~saitoahop/Cyniclomyces.htm>. Accessed on: Nov 3 2009
- Sherding RG, Johnson SE (2008) Doenças intestinais. In: Birchard SJ, Sherding RG (eds) *Manual Saunders de clínica de pequenos animais*, 3ª ed. Editora Rocca, São Paulo
- Smith MT, Robert V, Poot GA et al (2005) Taxonomy and phylogeny of the ascomycetous yeast genus *Zygoascus*, with proposal of *Zygoascus meyeriae* sp. nov. and related anamorphic varieties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1353–1363
- Zierdt CH, Detlefsen C, Muller J et al (1988) *Cyniclomyces guttulatus* (*Saccharomycopsis guttulata*)-culture, ultrastructure and physiology. *Antonie Leeuwenhoek* 54:357–366

Anexo 2. FLAUSINO, G.; BERTO, B.P.; MCINTOSH, D.; FURTADO, T.T.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES, C.W.G. Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs. *Acta Protozoologica*, 2013.

Phenotypic and genotypic characterization of *Eimeria caviae* from guinea pigs

Gilberto Flausino¹, Bruno P. Berto², Douglas McIntosh³, Tassia T. Furtado¹, Walter L. Teixeira Filho³, Carlos Wilson G. Lopes³

¹ Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), RJ, Brasil.

² Departamento de Biologia Animal, UFRRJ, RJ, Brasil

³ Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 km 7, 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil – CNPq fellowship

* Adress for correspondence: Carlos W. G. Lopes, Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/ UFRRJ), BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, RJ, Brazil. E-mail: lopescwg@ufrj.br

Abstract

Coccidiosis in Guinea pigs (*Cavia porcellus*) has been frequently associated with the presence of *Eimeria caviae*; however, this Coccidium has never been characterized in detail. This study aimed to present the phenotypic and genotypic characterization of *E. caviae* from guinea pigs reared under rustic breeding conditions in Brazil. *Eimeria caviae* oocysts are polymorphic, being sub-spherical, ovoidal or ellipsoidal, $20.9 \times 17.7 \mu\text{m}$, with a smooth or slightly rough and bi-layered wall, $\sim 1.0 \mu\text{m}$. Micropyle and oocyst residuum are absent, but one polar granule is present. Sporocysts are ellipsoidal, $10.8 \times 6.4 \mu\text{m}$. Stieda and parastieda

bodies are present, sporocyst residuum is present and sporozoites possess a refractile body and a nucleus. Line regressions and histograms were performed and confirmed the polymorphism of the oocysts. The internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region of ribosomal RNA genes were sequenced and showed no significant homology to the same genomic region of any other *Eimeria* species.

Keywords: oocysts, coccidiosis, diagnostic, morphology, morphometry, ITS-1, Rio de Janeiro, Brazil.

1. Introduction

Guinea pigs (*Cavia porcellus*) are small rodents raised in the South American Andes Mountains primarily as a food source. However, the breeding of Guinea pigs has long been established worldwide, as a source of pets and laboratory animals (Sachser, 1998).

Guinea pigs can be affected by various non-infectious and infectious (bacterial, viral, fungal and protozoan), diseases. Among the protozoa, *Balantidium* sp., *Cyathodium* sp., *Giardia muris*, *Leishmania enrietti* and coccidia are the most frequently reported (Rigby, 1976; Andrade et al., 2002). Coccidiosis in Guinea pigs has frequently been associated with the presence of *Eimeria caviae*, although other coccidian species, namely *Cryptosporidium* spp., *Klossiella* spp., *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis caviae* have also been observed as parasites of these animals.

Eimeria caviae was first described by Sheather (1924), where oocysts and endogenous stages were observed in the epithelium of the colon. Subsequently, Henry (1932) and Lapage (1940) provided morphological data in relation to gametocytes and oocysts of this coccidian. Interestingly, Zwart and Strik (1961) considered *E. caviae* and *E. dolichotis* as representing a

single species; however, the latter did not develop in experimentally infected Guinea pigs. Moore (1976) performed experimental infections in Guinea pigs in conjunction with a cytological study on the sporozoites of *E. caviae*. More recently, the studies of Hankinson et al. (1982), Muto et al. (1985), Fujino et al. (1991) and Matsui et al. (1996) served to improve our knowledge of the life cycle and interspecific competition of the parasite. Nevertheless, it is somewhat surprising that despite having been the subject of numerous studies, the phenotypic characterization of this species has not been fully developed. Moreover, relative to other *Eimeria* species, there exists a dearth of genotypic data available for this parasite relative to other *Eimeria* species

The present study aimed to produce a detailed phenotypic description of this parasite, isolated from guinea pigs reared under rustic breeding conditions in Brazil, and to provide preliminary genotypic characterization via sequencing of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region of ribosomal RNA.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and processing

Fecal samples were collected from 30 Guinea pigs derived from a single rustic breeding facility located in the Municipality of Seropédica (22° 44' 29" S and 43° 42' 19" W), in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Samples were collected immediately after defecation and placed into plastic vials with potassium dichromate 2.5% solution (K₂Cr₂O₇), at a ratio of 1:6 (v/v). Samples were transported to the Laboratório de Coccídios e Coccidioses located at Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). They were placed in a thin layer (~ 5 mm) K₂Cr₂O₇ 2.5% solution in Petri plates, and incubated at 23-28°C for 10 days or until 70% of oocysts were sporulated. Oocysts were recovered by

flotation in Sheather's sugar solution (sp. g. 1.20) and examined microscopically using the technique described by Duszynski and Wilber (1997). A total of 10% (3/30), of the samples were recorded as being positive for the presence of *E. caviae*.

2.2. Observation, measurement and illustration of oocysts

Morphological observations and measurements, provided in micrometres, were made using a Carl Zeiss binocular microscope fitted with an apochromatic oil immersion objective lens and an ocular micrometer (K-15X PZO, Poland). Line drawings were prepared using a Wild M-20 binocular microscope with a drawing tube. Size ranges are shown in parenthesis followed by the average and shape index (L/W ratio).

2.3. Statistical evaluation

Two statistical methods were employed: (1) Histograms were prepared to plot the values of length, width and the shape-index of the oocysts, as well as their relative frequencies, according to the methods of Sampaio (2002) and Berto et al. (2008a; 2008b; 2008c; 2011); (2) Linear regression determined the distribution of *E. caviae* oocysts, using methods proposed by Norton and Joyner (1981) and applied by Sampaio (2002) and Berto et al. (2008a; 2008b; 2008c; 2011). The graphics and coefficients of regression lines were obtained using the software Microsoft Excel 2007 ®.

2.4. DNA extraction

Concentrated oocysts with the number of 10^6 per sample were suspended in duplicate in 300 µl of ice cold phosphate buffered saline (pH 7.2), in screw capped 1.5mL microcentrifuge tubes containing 50 mg of glass beads (Sigma-Aldrich; product # G8772). Tubes were placed in a mini-beadbeater-16 apparatus (Biospec; Bartlesville, OK, USA), and

the cells were disrupted using a single cycle of agitation (60 seconds). Cell lysis was completed by the addition of 300 μ l of cell disruption solution (20mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 400mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulphate), with lysates incubated overnight at 56^oC. DNA was extracted by single rounds of phenol and phenol chloroform treatment, followed by precipitation with an equal volume of isopropanol for 20 minutes at room temperature. Precipitated (16,000 X g for 15 min) DNA pellets were desalted twice with 70% ethanol and re-suspended overnight at 4^oC in 50 μ l of molecular biology grade water (Sigma-Aldrich), with subsequent storage at -20^oC. DNA concentration was determined spectrophotometrically using a Nanodrop 2000 apparatus (Thermo-Scientific).

2.5. Polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing

The primers (genus-common), reaction components and cycling conditions described by Kawahara et al., (2010), were used to amplify the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) region of ribosomal RNA genes. An aliquot (5 μ l) of each PCR reaction was examined by agarose gel electrophoresis to confirm the presence of a single amplicon. Remaining PCR products were treated with Exo-Sap-IT (USB) according to the manufacturer's protocol and sequenced in both directions, using the amplification primers by use of the BigDye Ready Reaction mix (ABI Corp); reaction products were analyzed on a Prism 3700 automated DNA analyser (ABI Corp). Sequence alignments were performed using Sequencher (Version 5.0, Genecodes Corporation). All sequences were entered into the BLAST search algorithm (Altschul et al., 1990) and the NCBI nucleotide database to determine gene identity.

3. Results

In a total of 30 Guinea pigs were examined; three of them shed oocysts in the feces. Initially, the oocysts were non-sporulated, a level of 70% sporulation occurred between 4 to 7 days in a 2.5% solution of a $K_2Cr_2O_7$ 2 incubated at 23-28°C.

3.1. *Eimeria caviae* Sheather, 1924 (Figs. 1 and 2)

3.1.1. *Species description*

Sporulated oocysts are polymorphic, being sub-spherical, ovoidal or ellipsoidal, measure $20.9 (14-25) \times 17.7 (14-21)$ (n=150) and present shape-index 1.2 (1.0-1.5). They are smooth or slightly rough, with a 1.0 (0.9-1.2) thick bi-layered-wall. Micropyle and oocyst residuum are absent, but one polar granule is present. Sporocysts are ellipsoidal and measure $10.8 (7-13) \times 6.4 (4-9)$ (n=150). They present shape-index 1.7 (1.2-2.3), are smooth, thin and single-layered wall. Stieda body is evident and triangular, ~ 1.0 high \times 2.0 wide. The parastieda body is flattened, ~ 0.5 high \times 2.0 wide. Sporocyst residuum is composed of few scattered granules. The sporozoites have a robust posterior refractile body and a centrally located nucleus.

3.1.2. *Type materials*

Type-host: The Guinea pig, *Cavia porcellus* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Caviidae).

Type-locality: Municipality of Seropédica (22° 44' 29" S and 43° 42' 19" W) in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

Material deposited: Phototypes and line drawings are deposited at the Parasitology Collection, in the Department of Animal Parasitology, UFRRJ, located in Seropédica, Rio de Janeiro State, Brazil. The repository number is P-25/2013.

3.1.3. Morphometric characterization

The histograms and linear regression of *E. caviae* sporulated oocysts can be visualized in Figs. 3 and 4 respectively. In the histograms of length, width and shape-index it was observed that the frequencies of the different classes increased and declined gradually; in other words, the oocyst measurements are in smaller quantities in the limits of values and in greater quantity in median values. In relation to linear regression, the R^2 value was less than 0.4 and the points were distributed distant from the regression line on the graph, which served to demonstrate the polymorphism of the oocysts.

3.1.4. Genotypic characterization

Amplifications using 100fg of DNA as template generated single amplicons with an approximate size of 350 base pairs (bp). Two individual amplicons were sequenced in both directions and aligned using Sequencher 5.0. To determine the size of the ITS-1 component of the *E.caviae* amplicon, sequences corresponding to the genes encoding the 18S ribosomal RNA (rRNA) and 5.8S rRNA of *Eimeria tenella* (GenBank accession number AF026388) were aligned with the *E.caviae* sequence. This analysis demonstrated that the ITS-1 region was 232 nucleotides in length. The sequence did not demonstrate significant nucleotide homology with any other sequence deposited in the GenBank, database. The sequence of the entire amplicon (352 bp), was deposited in the GenBank with the accession number (KC484340).

4. Discussion

The morphological data reported in the present study showed a high degree of similarity to the descriptions made by Henry (1932), Lapage (1940), Zwart and Strik (1961),

Moore (1976) and Muto et al. (1985) (Table 1). However, the current study provided insight into morphological characteristics not previously noted for oocysts of *E. caviae*, including the possibility of a slightly rough wall and the presence of a parastieda body. It is noteworthy that the latter feature has been described infrequently in Eimeriidae species (Duszynski and Wilber, 1997). Those authors characterized this structure as representing a substieda body located at the opposite end of the Stieda body; however, in this study we identified the parastieda body as a structure resembling another Stieda body, located at the opposite end of the cell, which served to complicate the localization of the anterior and posterior ends. Furthermore, we observed bands below the Stieda and parastieda bodies, with similarity to substieda bodies (Fig 2). Owing to the lack of opacity of this structure is not possible to conclusively describe it as a substieda body; however this observation has been depicted in the line drawing (Fig. 1).

Morphometric data from the current study served to characterize the polymorphic nature of the oocysts, which can be sub-spherical, ovoidal or ellipsoidal. This polymorphism can be observed in the line drawings (Fig. 1a-c) and photomicrographs (Fig. 2) and was verified in the linear regression (Fig. 3c), which stated a low proportionality for the values of width on length.

Oocyst polymorphism has been described previously by several authors for a variety of coccidia including, *Isoospora lacazei* from the house sparrow *Passer domesticus*, in the Province of Cordoba, Spain (Gomez et al. 1982), *E. opimi*, from tuco-tucos *Ctenomys* spp., in Bolivia (Gardner & Duszynki 1990), *Tyzzeria parvula* from greylag geese *Anser anser* (Berto et al. 2008b), *Eimeria bareillyi* of domestic water buffalos *Bubalus bubalis* (Ramirez et al. 2009b) and *Isoospora sepetibensis* from thraupid passerines in Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil (Berto et al. 2011). Several factors may have a role in the existence of the observed polymorphism: (1) stress; (2) nutrition; (3) immunity of the host; (4) the infecting

dose (Fayer, 1980; Joyner, 1982); (5) the time of oocysts discharge during the patent period (Duszynski, 1971; Catchpole et al., 1975; Joyner, 1982); and (6) phenotypic plasticity, when a *Coccidium* activates different phenotypes in response to its environment (Parker & Duszynski 1986; Gardner & Duszynski, 1990).

The histograms based on length and width data (*Fig. 3a*) showed a regular distribution. However, the histogram of shape-index (*Fig. 3b*) revealed a higher frequency in the range of values from 1.0 to 1.3. This observation indicates a tendency for the oocysts to adopt a sub-spherical to ovoidal shape. It is of interest that similar results were recorded by Berto et al. (2008a; c; 2011) for *Isoospora hemidactyli* recovered from the house gecko *Hemidactylus mabouia*; *Eimeria bateri* from the Japanese quail *Coturnix japonica*; and *Isoospora* spp. from thraupid passerines at the Marambaia Island, Rio de Janeiro, Brazil.

Transcription of the ITS-1 region of the nuclear genome does not result in a functional product, which means that these sequences can tolerate an elevated degree of mutation relative to the genes encoding the different subunits of the ribosomal RNA (Oliveira et al., 2010). As such, this marker may be indicated for population studies making use of the intra-specific sequence variations as discriminatory characters (Schnitzler et al., 1998). The taxonomy of the coccidia has historically been morphologically based. However, The ITS-1 region of the nuclear genome has been used as a molecular marker, and as the basis for discriminatory detection, in numerous studies of coccidian parasites including seven species of *Eimeria* from domestic chickens (Schnitzler et al., 1998; Schnitzler et al., 1999), six species of *Eimeria* which infect bovines (Kawahara et al., 2010), the eleven known species of *Eimeria* associated with the domestic rabbit (Oliveira et al, 2010). More recently it has been applied, in conjunction with ITS-2, to examine how *Eimeria callospermophili* isolated from ground dwelling squirrel hosts (Rodentia: Sciuridae) are related to eimerian species from other sciurid hosts (Motriuk-Smith et al., 2011).

The ITS-1 sequence recorded for *E.caviae* showed no significant homology the ITS-1 region of any other *Eimeria* species. Clearly, sequencing of additional isolates will be necessary to confirm the utility of this region as a genotypic marker for this species. The DNA used for PCR was derived from cultures which contained the three morphotypes of the parasite and was amplified using primers which were designed to anneal to conserved regions of the 18S and 5.8S rDNA of the genus *Eimeria* (Kawahara et al., 2010). Without exception the sequencing chromatograms were composed of clearly defined peaks, with no evidence for secondary peaks which would indicate the presence of more than one amplicon in the PCR product. As such, the genotyping data provide support to the conclusion that the three types of oocyst observed in the phenotypic analysis represented polymorphic variants of the same species rather than a mixture of different species.

Acknowledgements

The authors are thankful to guinea pig rustic breeders at the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil, for permitting and assisting in the collection of material. Financial support was provided by CNPq and FAPERJ.

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215: 403–410.

Andrade, A., Pinto, S., Oliveira, R. 2002. *Animais de Laboratório: Criação e experimentação*. Rio de Janeiro, Fiocruz.

- Berto, B.P., Lopes, B.doB., Flausino, W., Teixeira-Filho, W.L., Lopes, C.W.G. 2008a. Contribution on the study of *Isospora hemidactyli* Carini, 1936 and a report of an adeleid pseudoparasite of the house gecko *Hemidactylus mabouia*, from the Rio de Janeiro Metropolitan Region, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 17, 150-154.
- Berto, B.P., Flausino, W., Almeida, C.R.R., Lopes, C.W.G. 2008b. Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 conditioned in two distinct sites. *Rev Bras Med Vet.*, 30, 215-219.
- Berto, B.P., Cardozo, S.V., Teixeira-Filho, W.L., Ferreira, A.M.R., Lopes, C.W.G. 2008c. Aflatoxin effect on the oocysts morphometry and contribution on the morphology of *Eimeria bateri* Bhatia, Pandey and Pande, 1965 of the Japanese quail *Coturnix japonica*, in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*, 17, 235-238.
- Berto, B.P., Luz, H., Flausino, W., Teixeira-Filho, W.L., Ferreira, I., Lopes, C.W.G. 2011. Isosporoid Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) parasites of tanagers (Passeriformes: Thraupidae) from the Marambaia Island, Brazil. *Pesq Vet Bras.*, 31, 798-805.
- Catchpole, J., Norton, C., Joyner, L. 1975. The occurrence of *Eimeria weybridgensis* and other species of coccidia in lambs in England and Wales. *Br Vet J.*, 131, 392-401.
- Duszynski, D. 1971. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *J Parasitol.*, 57, 948-952.
- Duszynski, D., Wilber, P. 1997. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *J Parasitol.*, 83, 333-336.
- Fayer, R. 1980. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Vet Parasitol.*, 6, 75-103.
- Fujino, T., Matsui, T., Morii, T. 1991. Endogenous stages and the other biological characteristics of *Eimeria caviae* in guinea pigs. *Kisechugaku Zasshi.*, 40, 368-373.

- Gardner, S., Duszynski, D. 1990. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *J Parasitol.*, 76, 805-811.
- Gomez, F., Navarrete, I., Rodriguez, R. 1982. Influencia de los factores ambientales sobre diferentes poblaciones de *Isospora lacazei* Labbé, 1983 (Protozoa: Apicomplexa). *Rev Iber Parasitol.*, 42, 185-196.
- Hankinson, G., Murphy, J., Fox, J. 1982. Diagnostic exercise. *Eimeria caviae* infection with concurrent *Balantidium coli* infection. *Lab Anim Sci.*, 32, 35-36.
- Henry, D. 1932. Coccidiosis of the guinea pigs. *Univ Calif Publ Zool.*, 37, 211-268.
- Joyner, L. 1982. Host and Site specificity. In: Long, P. 1982. *The biology of the Coccidia*. Baltimore: University Park Press, 35-62.
- Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, Nunoya T. 2010. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. *Vet Parasitol.*, 174, 49- 57.
- Lapage, G. 1940. The study of coccidiosis in the guinea pig. *Vet J.*, 96, 144-54, 190-202, 242-54, 280-295.
- Matsui, T., Fujino, T., Kobayashi, F., Tsutsumi, Y., Tsuji, M. 1996. Attenuation of *Eimeria caviae* by selection for precocious development. *Int J Parasitol.*, 26, 1243-1248.
- Moore, C. 1976. A cytological study of the sporozoites of *Eimeria caviae*, a coccidian parasite of the domestic guinea pig, *Cavia porcellus*. Thesis. Drake University, School of Graduate Studies. United States.
- Motriuk-Smith, D., Scott Seville, R., Leah Quealy, L., Clinton, E., Oliver, C.E. 2011. Comparison of the ITS1 and ITS2 rDNA in *Eimeria callospermophili* (Apicomplexa: Eimeriidae) from Sciurid Rodents *J Parasitol.*, 97, 305–310.

- Muto, T., Sugisaki, M., Yusa, T., and Noguchi, Y. 1985. Studies on coccidiosis in guinea pigs. Clinico-pathological observations. *Experim Anim.*, 34, 23-29.
- Norton, C. C., & Joyner, L. P. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology*, 83, 269-279, 1981.
- Oliveira, U.C., Fraga, J.S., Licois, D., Pakandl, M., Gruber, A. 2011. Veterinary Parasitology Development of molecular assays for the identification of the 11 *Eimeria* species of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Parasitol.*, 176, 275–80.
- Parker, B., Duszynski, D. 1986. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *J Parasitol.*, 72, 602-604.
- Ramirez, L., Berto, B., Teixeira-Filho, W., Flausino, W., Meireles, G., Rodrigues, J., Almeida, C., Lopes, C. 2009b. *Eimeria bareillyi* from the domestic water buffalo, *Bubalus bubalis*, in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Med Vet.*, 31, 261-264.
- Rigby, C. 1976. Natural infections of Guinea pigs. *Lab Anim.*, 10, 119-142.
- Sachser, N. 1998. Of domestic and wild Guinea pigs: Studies in sociophysiology, domestication, and social evolution. *Naturwissen*, 85, 307–317.
- Sampaio, I. B. M. 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte, FEP MVZ Editora.
- Schnitzler, B.E., Thebo, P.L., Mattsson, J.G., Tomley, F.M., Shirley, M.W. 1998. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.*, 27,490-497.
- Schnitzler, B.E., Thebo, P.L., Tomley, F.M., Uggla, A., Shirley, M.W. 1999. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. *Avian Pathol.* 28, 89-93.
- Sheather, A. 1924. Coccidiosis in the Guinea Pig. *J Comp Path.*, 37, 243-246.

Zwart, P., Strik, W. 1961. Further observations on *Eimeria dolichotis*. a coccidium of the Patagonian cavy (*Dolichotis patagonica*). J Protozool., 8, 58-59.

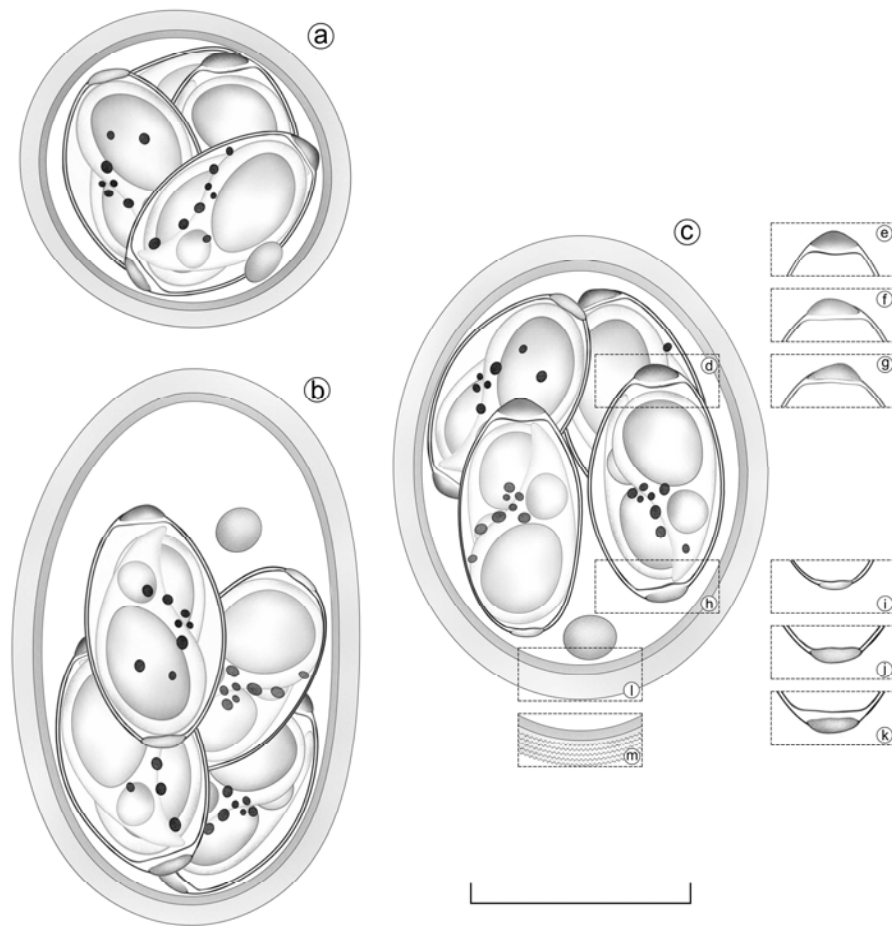


Fig. 1. Line drawings of sporulated oocysts of *Eimeria caviae*, a coccidium species recovered from Guinea pigs *Cavia porcellus*: (a) sub-spherical, (c) ellipsoidal, and (c) ovoidal oocysts; (d-g) variations of the Stieda bodies; (h-k) variations of the parastieda bodies; (l-m) variations of roughness of the oocyst wall. Scale-bar: 10 μ m.

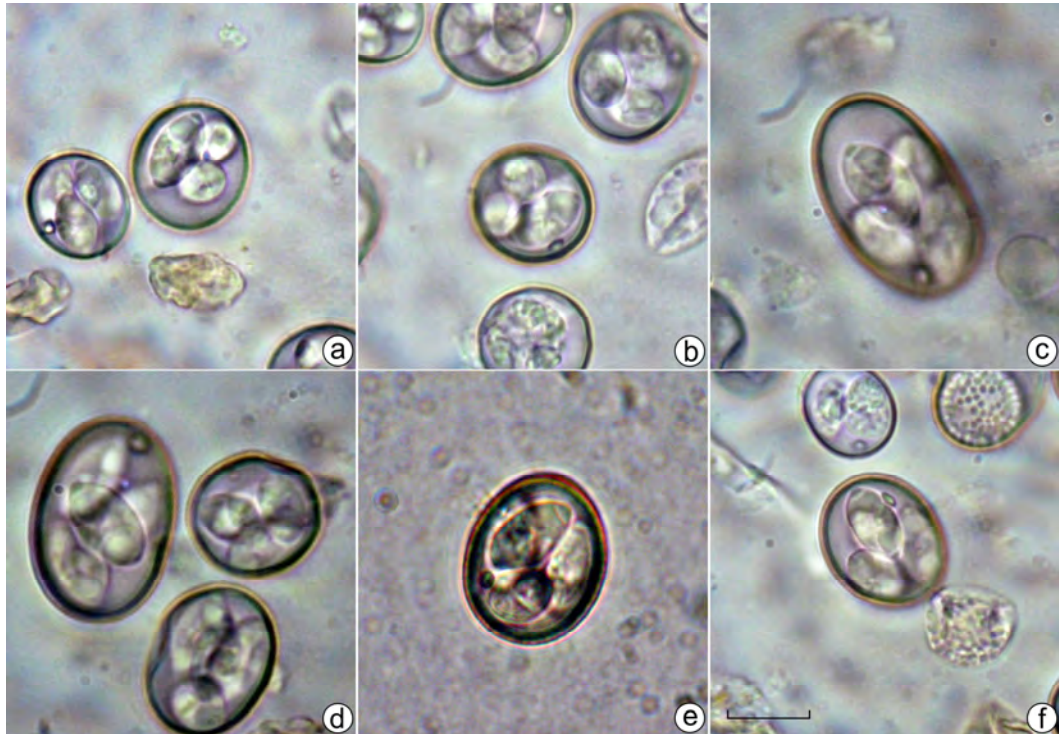


Fig. 2. Photomicrographs of sporulated oocysts of *Eimeria caviae*, a coccidium species recovered from Guinea pigs *Cavia porcellus*: (a, b, d) sub-spherical, (c, d) ellipsoidal, and (d, e, f) ovoidal oocysts. In (d) three shapes can be observed in the same field. Sheather's sugar solution. Scale-bar: 10 μ m.

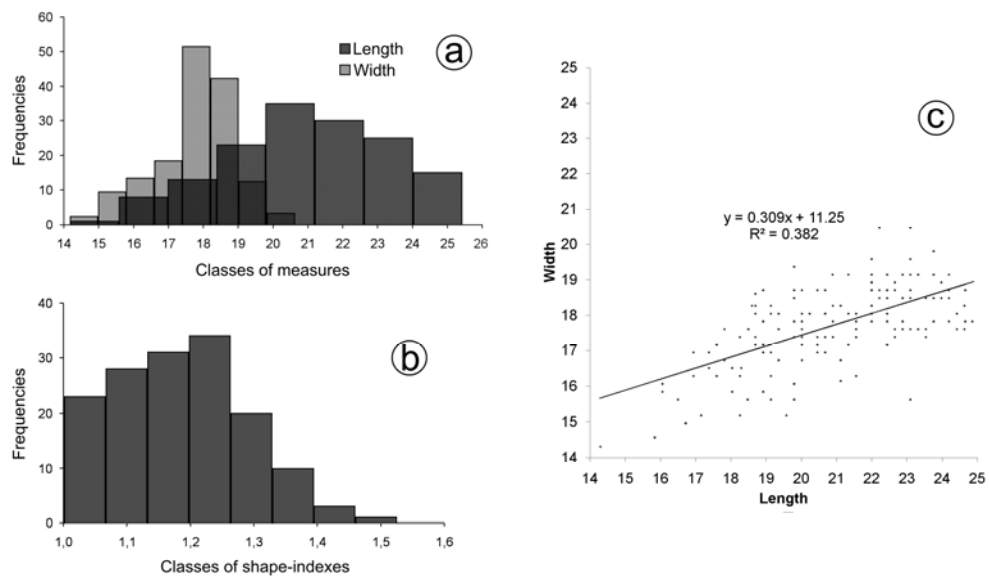


Fig. 3. Histograms of (a) length, width and (b) shape-index, and (c) linear regression of the oocysts of *Eimeria caviae*, a coccidium species recovered from Guinea pigs *Cavia porcellus*.

Table 1 Comparative morphology of *Eimeria caviae* recovered from Guinea pigs *Cavia porcellus*.

References	Oocysts				Sporocysts				
	Shape	Measurements (μm)	Shape index	Polar granule	Shape	Measurements (μm)	Stieda body	Parastieda body	Residuum
Sheather (1923)	-	(15.9-24.6 \times 12.2-17.4)			-	-	present	-	-
Ellis and Wright (1961)	-	18 \times 15			-	-	present	-	-
Lapage (1940)	-	19 \times 16 (17-25 \times 13-18)	-	-	-	-	present	-	-
Zwart and Strik (1961)	-	(17.6-27.0 \times 17.0-21.0)	1.24	-	-	(8-13 \times 5-7)	-	-	-
Moore (1976)	ellipsoidal	22.6 \times 20.8 (19.9-25.9 \times 17.2-24.3)	1.1	present	-	13.1 \times 7.2	present	-	-
Muto et al. (1985)	sub-spheroidal to ellipsoidal	20 \times 17	-	-	-	-	-	-	-
Present study	sub-spherical, ovoidal or ellipsoidal	20.9 \times 17.7 (14-25) \times (14-21)	1.2 (1.0-1.5)	present	ellipsoidal	10.8 \times 6.4 (7-13) \times (4-9)	evident and triangular, ~1 \times 2	flattened, ~0,5 \times 2	diffuse

Anexo 3. FURTADO, T.T.; **FLAUSINO, G.**; LEAL, P.D.S.; FERREIRA, J.P.; McINTOSH, D.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA FILHO, W.L.; LOPES C.W.G. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães – Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(1): 00-00, 2013.

**DIAGNÓSTICO DE COLANGITE ASSOCIADO À MUCOCELE DA
VESÍCULA BILIAR POR *Cyniclomyces guttulatus* EM CÃES – RELATO DE
CASO***

Tássia Teixeira Furtado¹, Gilberto Flausino², Paulo Daniel de Sant'Anna Leal³, Juliana
Pinto Ferreira⁴, Douglas McIntosh⁵, Walter Flausino⁶, Walter Leira Teixeira Filho⁶ e
Carlos Wilson Gomes Lopes⁷⁺

ABSTRACT. Furtado T.T., Flausino G., Leal P.D. de S., Ferreira J.P., McIntosh D.,
Flausino W., Teixeira Filho W.L. & Lopes C.W.G. [**Diagnosis of cholangitis associate
to mucocele in gallbladder due to *Cyniclomyces guttulatus* in dogs - Case report**]
Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces
guttulatus* em cães – Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(1):
00-00, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de
Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7, Seropédica, 23897-
970, RJ, Brasil. E-mail: lopescwg@ufrj.br

Vegetative cells of an ascomycete, morphologically similar to descriptions of
Cyniclomyces guttulatus. These were observed on the surface of the mucosa of the
gallbladder and stomach wash of two dogs with a history characterized by diarrhea,
vomiting, stomach mucosal thickening and hypertrophy of the gallbladder determined
by ultrasound examination.

KEY WORDS. *Cyniclomyces guttulatus*, gallbladder, dogs, natural infection,
cholecystitis.

*Recebido em

Aceito em

¹ Bióloga, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Instituto de Veterinária
(IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, 23897-970, RJ.
E-mail: tassia@ufrj.br

² Médico-veterinário, Zootecnista, DSc. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária,
IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, 23897-970, RJ. E-mail: gilflausino@ufrj.br,

³ Médico-veterinário, *M.Med.Vet.* PPGCV, IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, 23.897-970, RJ.

E-mail: paulodaniel@ctiveterinario.com.br

³ Médica-veterinária, Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária. Av. das Américas, 3939 – Bl. 2 – Lj I – Shopping Esplanada da Barra, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, 22631-003, RJ. E-mail: ctiveterinario@ctiveterinario.com.br

⁴ Microbiologista, PhD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA). IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, 238897-970, RJ. E-mail: mcintosh@ufrj.br

⁵ Biólogo, *PhD.* DPA. IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, 238897-970, RJ. E-mails: flausino@ufrj.br, leira@ufrj.br – bolsista CNPq

⁶ Médico-veterinário, PhD, LD. DPA. IV, UFRRJ. BR 465 Km 7, Seropédica, 238897-970, RJ. +Autor for correspondency. E-mail: lopescwg@ufrj.br – bolsista CNPq

RESUMO. As células vegetativas de um ascomiceto, morfológicamente semelhante às descrições de *Cyniclomyces guttulatus*. Estes foram observados na superfície da mucosa da vesícula biliar e na lavagem estomacal de dois cães com histórico caracterizado por diarreia, vômitos, espessamento da mucosa do estômago e hipertrofia da vesícula biliar por exame de ultrassom.

PALAVRAS-CHAVE. *Cyniclomyces guttulatus*, vesicular biliar, infecção natural.

INTRODUÇÃO

As doenças que acometem o sistema hepatobiliar em cães, em particular a obstrução biliar extra-hepática ocorre quando há alteração no fluxo normal da bile, devido a diversas causas. Historicamente, a incidência de doenças restritas à vesícula biliar é baixa, no entanto, com o uso de diagnóstico de rotina de ultrassonografia abdominal, a incidência de mucocele da vesícula biliar e colelitíase têm aumentado (Center 2009). Em geral, são achados de exame e dificilmente implicam em sinais clínicos identificáveis, porque frequentemente estes são discretos, temporários e recidivantes. A icterícia é mais notada quando material lodoso ou cálculos causam a obstrução do ducto biliar (Slatter 1998). Também podem ser notados vômito, depressão, perda de peso, febre, desidratação, fezes acólicas e dores abdominais associadas à colecistite ou obstrução do ducto biliar (Slatter 1998, Willard & Fossum 2005). A ultrassonografia pode auxiliar na detecção de obstrução de vias biliares e suas causas (Willard & Fossum 2005). A mucocele da vesícula biliar é diagnosticada com maior frequência em cães,

mas a sua verdadeira incidência permanece incerto. A causa subjacente a esta condição ainda é controversa, mas há uma forte associação com a hiperplasia das glândulas mucosas no epitélio da vesícula biliar. Embora o tratamento cirúrgico tenha sido o tratamento de eleição, a evidência baseada em casos recentes sugere que alguns pacientes podem responder ao tratamento médico (Quinn & Cook, 2009). Mucocele geralmente são relatados em cães de pequeno e médio porte, e cães pastores de Shetland e Cocker spaniels são mais acometidos (Worley et al. 2004). A maioria dos pacientes com mucocele são mais velhos (média de idade de 9 anos), predileção por sexo não tem sido estabelecida (Neer 1992). Pode ser difícil compreender as diferenças entre lama biliar e mucocele no exame ultra-sonográfico, lama biliar é móvel e dependente da gravidade, enquanto que uma mucocele é imóvel e exibe um padrão distinto estriado ou estrelado (Besso et al. 2000).

Para o diagnóstico além dos testes laboratoriais de rotina, a colescintiscopia pode ser realizada, com o objetivo do isolamento do microorganismo responsável através de cultura de aeróbios, anaeróbios e fungos, os isolados mais comuns são a *Escherichia coli* e *Enterobacter*, *Enterococcus*, e *Clostridium* (Wagner et al. 2007). Dentre as infecções fúngicas, a presença de um ascomiceto do gênero *Cyniclomyces* vem sendo assinalada com alguma frequência em fezes de cães (Houwens & Blankenstein 2001, Gjerde et al. 2009, Dijkstra et al. 2010, Flausino et al. 2012), estômago (Flausino et al. 2012) e associado a colecistite supurativa e colangiohepatite em cães (Neel et al. 2006), em cães com gastrite crônica foram encontradas quantidades de *C. guttulatus* no lavado gástrico e nas fezes, sendo que o seu diagnóstico foi baseado na identificação microscópica, no isolamento através de cultivo e no sequenciamento do DNA desta espécie encontrada no Brasil (Flausino et al. 2012).

O presente trabalho teve como objetivo assinalar o diagnóstico e tratamento da infecção por *C. guttulatus* associado à colangite e colângiohepatite em dois cães.

HISTÓRICO

Dois cães foram atendidos no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária, localizado na Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, RJ; ambos com 17 anos de idade e sem raça definida.

Caso 1

Portador de insuficiência cardíaca congestiva, emagrecimento progressivo nos últimos oito meses, anorético há dois dias, episódios de vômitos, episódio de diarreia há 15 dias, prostrado, dispnéia e fraqueza muscular, com 11,6 kg de peso vivo. Ao exame clínico apresentava aumento abdominal sugestivo de ascite, temperatura retal de 37,8⁰C; frequência cardíaca de 120 batimentos por minuto, frequência respiratória de 32 movimentos por minuto, pulso arterial de apresentação intensa; tempo de preenchimento capilar de 3 segundos; palidez mucosa oral, apresentava taxa de desidratação em torno de 6%.

Caso 2

Portador de insuficiência cardíaca congestiva, hiperadrenocorticismo, doença periodontal, gengivite e halitose intensa, eventuais episódios de vômitos, com 14 kg de peso vivo. Ao exame clínico apresentava temperatura retal de 38,8⁰C; frequência cardíaca de 112 batimentos por minuto, frequência respiratória de 40 movimentos por minuto, pulso arterial de apresentação intensa; tempo de preenchimento capilar de 2 segundos, ausculta torácica com sibilo expiratório.

Com o intuito de diagnóstico, foi solicitado exame de imagem ultrassonográfico do abdomen, coleta de fezes da ampola retal e sangue da veia jugular direita, com uma seringa de 8 mL, com agulha 25 x 7 mm, onde 3 mL foi acondicionado em tubo de ensaio pediátrico com ácido etilenodiaminotetracético (anticoagulante-EDTA), e 5 mL em tubo de ensaio pediátrico sem anticoagulante, com o material da própria seringa foi feito dois estiraços sanguíneos corados com Panótico Rápido LB para contagem específica dos leucócitos e observações pertinentes. As amostras foram processadas no próprio CTIVet, com a utilização de aparelho automático (Ms4-Vet-Melet Schloesing Laboratoires coulter), Refratômetro Portátil e Microcentrifuga (E3500108 *MICROSPIN* CDR), para hemograma completo (leucograma, eritrograma, plaquetometria e proteína total) e concentrado de leucócitos e plaquetas (capa leucocitária) em dois estiraços em lâminas de vidro, obedecendo a mesma técnica de fixação, desidratação e coloração para o estiraço sanguíneo. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas em centrífuga (Mod. 208N, Excelsa Baby, marca

Fanem Ltda.) a 350 G por 10 minutos, para separação do soro, e utilizando pipeta automática de 32µl, para alaninaminotransferase (ALT), bilirrubina total (BT), fosfatase alcalina (FAL), uréia (UR), Gamaglutamil transferase (GGT) em aparelho de fotometria de reflectância in vitro Reflotron[®] Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Baden-Württemberg) e utilizando o conjunto Katal Biotecnológica Ind. & Com Ltda, se obteve à determinação da albumina (g/dL).

Amostras de fezes foram coletadas e foram examinadas, para tanto, foi usado à técnica de centrifugo-flutuação com solução saturada de açúcar (Birgel et al. 1977). Nas fezes foram observadas células leveduriformes cilíndricas, isoladas ou em pequenas cadeias com morfologia semelhante ao do gênero *Cyniclomyces*, indicando a necessidade de coleta de material estomacal, devido ao fato de *C. Guttulatus* estar associado à gastroenterite em cães. Através de lavado gástrico, se utilizado sonda nasogástrica número 8, seringa de 60 mL e solução fisiológica a 0,8%, sem necessidade de medicação pré-anestésica. As amostras coletadas foram devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas e, imediatamente, levadas para o Laboratório de Coccídios e Coccidioses-Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. Amostras do conteúdo estomacal foram coradas a fresco, entre lâmina e lamínula, pelo azul de algodão lactofenol de Amann (Rippon 1974) e, desidratadas em metanol e coradas pelo Giemsa (Flausino et al. 2012).

Para o isolamento, o material procedente do lavado gástrico e fecal foi processado de acordo Flausino et al. (2012). No lavado estomacal dos dois animais foram observadas células vegetativas do ascomiceto *Cyniclomyces guttulatus* (Flausino et al 2012).

Foram obtidas colonias isoladas do material fecal de coloração ambar ao marron, com características próprias (cheiro e forma) de *C. Guttulatus* (Flausino et al. 2012). Preparados, entre lâmina e lamínula, de colonias isoladas, suspensas em solução salina a 0,85% e coradas pelo azul de algodão lactofenol mostraram células com morfologia característica do gênero *Cyniclomyces* (Flausino et al. 2012).

DISCUSSÃO

Nos animais desse estudo foram isolados do lavado gástrico, bile, fezes e visualizado no corte histológico da mucosa da vesícula biliar o ascomiceto *Cyniclomyces guttulatus*, que está associado aos sinais clínicos observados nos animais do presente estudo, como episódios de vômito e diarreia (Houwens & Blankenstein 2001, Gjerde et al. 2009, Dijkstra et al. 2010, Flausino et al. 2012). Os dois animais do atual estudo apresentavam o ascomiceto no material estomacal e nas fezes, o animal número 2 apresentava gastrite com a observação de cadeias longas deste ascomiceto, formando pseudo-hifas (Flausino et al. 2012).

Os resultados laboratoriais foram sugestivos para doença hepatobiliar com aumento da atividade de transaminases parenquimatosas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase) e enzimas colestáticas (fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase (Center 2009) e no exame de imagem ultrassonográfico, principal exame para o diagnóstico patologias da vesícula biliar (Willard & Fossum 2005, Romero et al. 2008) foi observado a presença de sedimento biliar com mucocele concordando com outros trabalhos, visto que os animais do presente estudo tinham idade de 17 anos e de médio porte e a maioria dos pacientes com mucocele são mais velhos com média de idade de 9 anos (Neer 1992) de pequeno e médio porte (Worley et al. 2004) e é concordante com os sinais clínicos apresentados, vômito, depressão, perda de peso (Slatter 1998, Willard & Fossum 2005). Pode ser difícil compreender as diferenças entre lama biliar e mucocele no exame ultrassonográfico. Lama biliar é móvel enquanto que uma mucocele é imóvel e exibe um padrão distinto estriada ou estrelado (Besso et al. 2000), o que foi observado na vesícula biliar do animal 1 após o óbito.

O tratamento instituído para tratar os processos patológicos induzidos pelo ascomiceto que se manifestaram por episódios de vômito, diarreia (Houwens & Blankenstein 2001, Gjerde et al. 2009, Dijkstra et al. 2010, Flausino et al. 2012,) e colangite (Neel & Tarigo 2006), foi com antifúngico sistêmico com fluconazol, que possui largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos e com a melhor absorção dentre os antifúngicos de sua categoria (Nobre et al. 2002), foi utilizado na dose de 5mg/kg de peso vivo (Sharp et al. 1991, Nobre et al. 2002), o qual se mostrou eficiente, pois não ocorreu a observação dessas estruturas no lavado gástrico e nas fezes

este foi preferido ao itraconazol, pois este já se mostrou incompetente no tratamento deste ascomiceto (Gjerde et al. 2009) e a nistatina que em experiência recente para tratamento de *C. guttulatus* indicou que a dosagem mais eficaz de nistatina para cães e gatos é 50.000 UI /kg, via oral a cada 24 horas por 4 dias (Peters & Houwers 2009) ou 500.000 UI/30 kg de peso corporal (Gjerde et al. 2009), porém é extremamente tóxica para uso parenteral e nas doses terapêuticas por via oral a absorção pelo trato gastrointestinal é praticamente inexistente (Sande & Mandell 1987).

Com base nos resultados da histopatologia não havia envolvimento bacteriano, apesar de diversas populações bacterianas serem encontradas, as mais comuns foram *Escherichia coli* e *Enterobacter*, *Enterococcus*, e *Clostridium* (Wagner et al. 2007). Esta observação é única, visto que o único relato de ascomiceto na vesícula biliar de cão esta associado à colonização bacteriana, sendo esta necessária para que ocorra a colangite clínica (Neel & Tarigo 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre A.L., Center S.A., Randolph J.F., Yeager A.E., Keegan A.M., Harvey H.J. & Erb H.N. Gallbladder disease in Shetland sheepdogs: 38 cases (1995-2005). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 231:79-88, 2007.
- Besso J.G., Wrigley R.H., Gliatto J.M. & Webster C.R. Ultrasonographic appearance and clinical findings in 14 dogs with gallbladder mucocele. *Vet Radiol Ultrasound*, 41: 261-271, 2000.
- Birgel E.H., Netto L.P., Amaral V., Giorgi W. & Panetta J.C. Meios e métodos de *diagnóstico em Medicina Veterinária*. 4ª ed. São Paulo, Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1977. 218 p.
- Burrows C.F., Batt R.M. & Sherding R.G. Diseases of the small intestine. In: Ettinger S.J., Feldman E. *Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1995. p. 1169-1232.
- Center S.A. Diseases of the Gallbladder and Biliary Tree. *Vet. Clin. North. Am.: Small Anim. Pract.*, 39:543-98, 2009.

- Dijkstra M., Kraus J.S. & Bosje J.T. Den Hertog E. Protein-losing enteropathy in Rottweilers. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 135: 406-412, 2010
- Ettinger S.J. *Manual de medicina Interna Veterinária*, 1^a ed., São Paulo, Editora Manole, 1996. 1011p.
- Flausino G. & Baroni F. de A. Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971) in Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 31:100-103, 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. *Curr. Microbiol.*, 65:542-546, 2012.
- Gjerde B., Holtet L., Sanden S. & Dahlgren S.S. Soppen *Cyniclomyces guttulatus* er 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.*, 121: 507-510, 2009.
- Guyton A.C. & Hall J.E. *Textbook of medical physiology*. 11^a Ed. Philadelphia, Elsevier Inc., 2006. p. 802-804.
- Hersey-Benner C. Diarrhea in a rabbit. *Cyniclomyces guttulatus* yeast. *Lab. Anim.*, (NY) 37:347-349, 2008.
- Houwers D.J. & Blankenstein B. *Cyniclomyces guttulatus* (Brillendoosjes-gist) endiarree bij honden. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 126:14-15, 2001.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. & Stalpers J.A. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi*. 10^a Ed. Wallingford, CABI. 2008. p. 1-746.
- Martínez Romero G., García Ortuño L.E., Casas F.C., Solís Carvajal K. & Méndez Aguilar R.E.. Mucocele en la vesícula biliar de un perro: hallazgos clínico-patológicos. *Veterinária, Mexico*. 39: 335-340, 2008.
- Mehler S.J. & Bennett R.A. A review of canine extrahepatic biliary tract disease and surgery. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.*, 28: 302-315, 2006.
- Neel J.A., Tarigo J. & Grindem C.B. Gallbladder aspirate from a dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 35:467-70, 2006.

- Neer T.M. A review of disorders of the gallbladder and extrahepatic biliary tract in the dog and cat. *J. Vet. Intern. Med.*, 6: 186-192, 1992.
- Nobre M. de O., Nascente P. da S., Meireles M.C. & Ferreiro L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Cienc. Rur.*, 32: 175-184, 2002.
- Nyland T.G. & Mattoon J.S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. 2.ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 95-130.
- Peters S. & Howers D.J. Een geval diarree geassocieerd met *Cyniclomyces guttulatus* (brillendoosjesgist) bij de kat. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 134: 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.
- Pike F.S., Berg J., King N.W., Penninck D.G. & Webster C.R.L. Gallbladder mucocele in dogs: 30 cases (2000–2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 224: 1615-1622, 2004.
- [Quinn R. & Cook A.K.](#) An update on gallbladder mucoceles in dogs. *Vet. Med.*, 103: 169-175, 2009.
- Richle R. & Scholer H.J. *Saccharomycopsis guttulata* Von Kaninchen: Kulturelle Eigenschaften Und Mögliche Bedeutung. *Path. Microbiol.*, 24: 783-793, 1961
- Rippon J.W. *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1974. 587p.
- 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. Disponível em: <<http://www33.ocn.ne.jp/~saitoahohp/Cyniclomyces.htm>>. Acesso em: 3 nov 2009.
- Sande M.A. & Mandell G.L. Drogas antimicrobianas –Drogas antimicóticas e antivirais. p.799-807. In: Goodman L. & Gilman A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. Cap. 54.
- Shaffer E.A. Review article: control of gall-bladder motor function. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 14 (supl. 2): 2–8, 2000.

- Sharp H., Harvey C.E. & O'Brien J.A. Treatment of canine nasal aspergillosis/penicilliosis with fluconazole. *J. Small Ani. Pract.*, 32: 513–516, 1991.
- Sherding R.G. & Johnson S.E. Doenças intestinais. p. 719-756. In: Birchard S.J. & Sherding R.G. *Manual Saunders de clínica de pequenos animais*. 3^a ed., São Paulo, Editora Rocca, 2008.
- Slatter D. Fígado e Sistema Biliar. p.783–798. In: Slatter D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2^a ed., São Paulo, Manole, 1998.
- Tsurumi K, Onda M. A fluorescence histochemical study for the motility of the gallbladder. *Gastroenterol. Jpn.*, 14:147-154, 1979.
- Wagner K.A, Hartmann F.A. & Trepanier L.A. Bacterial culture results from liver, gallbladder, or bile in 248 dogs and cats evaluated for hepatobiliary disease: 1998-2003. *J. Vet. Intern. Med.*, 21: 417-424, 2007.
- Willard M.D. & Fossum T.W. Diseases of the Gallbladder and Extrahepatic Biliary System. p. 1478–1482. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6^a ed., St. Louis, Elsevier, 2005.
- Worley D.R., Hottinger H.A. & Lawrence H.J. Surgical management of gallbladder mucoceles in dogs: 22 cases (1999-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 225: 1418-1422, 2004.
- Zierdt C.H., Detlefson C., Muller J. & Wagglie K.S. *Cyniclomyces guttulatus* (*Saccharomycopsis guttulata*)-culture, ultrastructure and physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54:357-366. 1988.

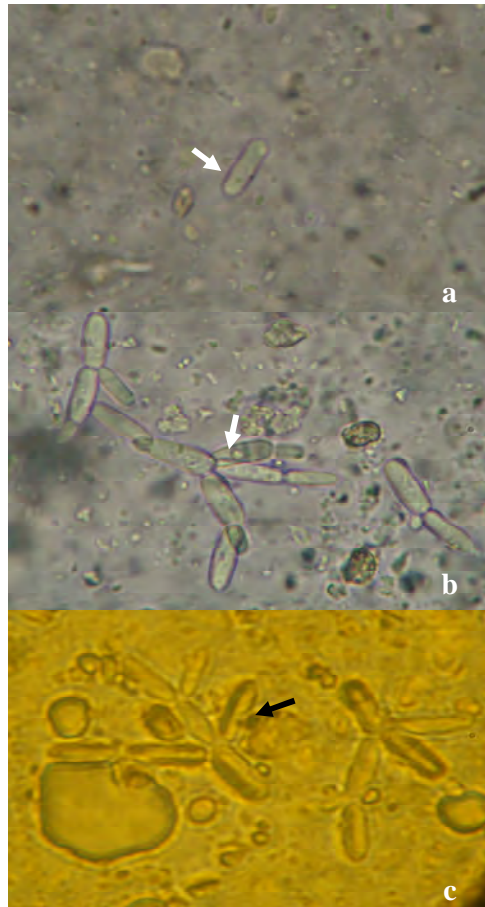


Figura 1. *Cyniclomyces guttulatus* (→) nas fezes (a), lavado gástrico (b) e em meio de cultura (c). 400X.

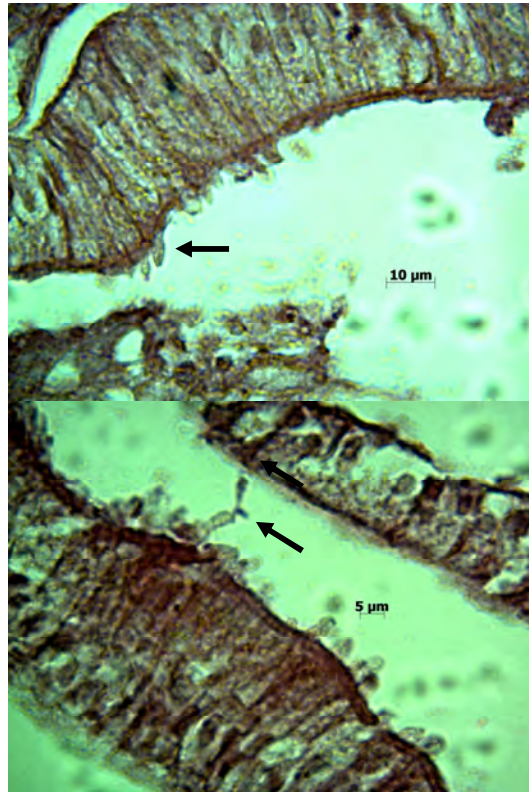


Figura 2. Vesícula biliar de Cão: *Cyniclomyces guttulatus* na mucosa (→). Células vegetativas, em desenvolvimento (a); pseudohifas (b). HE.

Tabela 1. Análise laboratorial dos animais com diagnóstico para *Cyniclomyces guttulatus* associado à colangite.

Parâmetros	Valores em mg/dL				Referência ^a
	Avaliações				
	Caso 1		Caso 2		
	1	2	1	2	
Albumina	2,10	2,8	- ^b	- <0,5	2,5 – 4,2
ALT (TGP)	246	77,9	43,9		C<89
Bilirrubina Total	4,48	<0,5	-	272	C<0,5
Fosfatase Alcalina	1420	114	132	72,1	C<164
Uréia	84,9	72,1	33,6	<0,5	C<54
Gama GT	17,3	16,0	-	65,8	C<20

^a Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Baden-Württemberg, RFA

^b Não avaliado (-)