

8 ANEXOS

Anexo 8.1. Declaração do CTI Veterinário



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizo a utilização de amostras fecais e lavado estomacal de cães, bem como ter acesso aos seus prontuários atendidos neste recinto sob minha responsabilidade para serem usados no ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cyniclomyces guttulatus* (ROBIN) VAN DER WALT E SCOTT (1971) DE CÃES PROCEDENTES DA BARRA DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO, RJ, cujos resultados farão parte dos dados da Dissertação de mestrado da Biomédica, TASSIA TORRES FURTADO, discente do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/IV desta IFES.

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2014.

Dr. Paulo Daniel Sant'Anna Leal DSc.
Médico Veterinário

ATENDIMENTO 24H
3326-0440 | 7840-7133

www.ctiveterinario.com.br | ctivet@ctiveterinario.com.br
Av. das Américas, 3939 - Bl.2 - Lj.1 - Shopping Esplanada da Barra,
Barra da Tijuca-RJ | CEP: 22631003 - CNPJ: 03274141/0001-90

Clínica Geral 24h | Anestesia e Controle da dor | Cardiologia Clínica, EcoDoppler e Eletrocardiograma | Cirurgia geral e Criocirurgia
Citologia, Histopatologia e Necropsia | Classificação sanguínea (tipo sanguíneo) | Colocação de Microchip | Dermatologia
Diagnóstico e Laboratório Clínico 24h | Endocrinologia | Endoscopia | Fisioterapia e Acupuntura | Ultrassonografia e Radiologia
Odontologia | Hematologia e Transfusão | Nefrologia | Neurologia Clínica e Cirúrgica | Oftalmologia Clínica e Cirúrgica
Oncologia Clínica e Cirúrgica | Ortopedia Clínica e Cirúrgica | Profilaxia com vacinas importadas.

Anexo 8.2 FURTADO T.T., FLAUSINO G., LEAL P.D. DE S., FERREIRA J.P., MCINTOSH D., FLAUSINO W., TEIXEIRA FILHO W.L., PAES-DE-ALMEIDA E.C. & LOPES C.W.G. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 35, n. 1, p. 1-6, 2013.

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

Tássia Torres Furtado¹, Gilberto Flausino², Paulo Daniel de Sant'Anna Leal³, Juliana Pinto Ferreira⁴, Douglas McIntosh⁵, Walter Flausino⁶, Walter Leira Teixeira Filho⁶, Elan Cardoso Paes-de-Almeida⁸ 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., Paes-de-Almeida E.C. & Lopes C.W.G. [Diagnosis of cholangitis associate to mucocele in gallbladder due to *Cyniclomyces guttulatus* in dogs - Case reports.] Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(1):1-6, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: lopescw@ufrj.br

Vegetative cells of an ascomycete, morphologically similar to previously descriptions of *Cyniclomyces guttulatus* were observed on the surface of the mucosa of the gallbladder, in samples of gastric lavage and feces of two dogs with a history characterized by diarrhea, vomiting, thickening of the stomach mucosa, and hypertrophy of the gallbladder. The diagnosis of biliary cholangitis was confirming by ultrasound examination and changes in liver enzymes. For treatment of this ascomycete fluconazol was used at a dose of 5mg/kg body weight which is efficient, because this was not observed ascomycete cells in gastric lavage and feces samples of these animals after treatment.

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

RESUMO. As células vegetativas de um ascomiceto, morfologicamente semelhantes às descrições anteriores de *Cyniclomyces guttulatus* foram observadas sobre a superfície da mucosa da vesícula biliar, em amostras de lavagem gástrica e fezes de três cães com história caracterizada por gastrite e colangiohepatite, com diarréia, vômitos, espessamento da mucosa do estômago e hipertrofia da

vesícula biliar. O diagnóstico de colangite biliar foi confirmando pelo exame de ultrassom e de alterações nas enzimas hepáticas. Para o tratamento deste ascomiceto foi utilizado fluconazol na dose de 5mg/kg de peso corporal, que foi eficiente, por não ser observado células deste ascomiceto na lavagem gástrica e nas amostras de fezes destes animais após o tratamento.

*Recebido em 19 de novembro de 2011.

Aceito para publicação em 7 de janeiro de 2013.

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, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: tassia@ufrj.br

² Médico-veterinário, Zootecnista, DSc. Departamento de Microbiologia, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 238897-970. E-mail: gilflausino@ufrj.br

³ Médico-veterinário, M.Med.Vet., PPGCV, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23.897-970. E-mail: paulodaniel@ctiveterinario.com.br

⁴ 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, RJ 22631-003. E-mail: ctiveterinario@ctiveterinario.com.br

⁵ Microbiologista, PhD. Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 238897-970. E-mail: mcintosh@ufrj.br

⁶ Biólogo, PhD. DPA, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 238897-970. E-mails: flausino@ufrj.br, leira@ufrj.br - bolsista CNPq.

⁷ Médico-veterinário, PhD, LD, Departamento de Parasitologia Animal, IV, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 238897-970. *Autor para correspondência. E-mail: lopescw@ufrj.br - bolsista CNPq.

⁸ Médica-veterinária, DSc., Departamento de Ciências Básicas, FCB, Universidade Federal Fluminense, Pólo Universitário de Nova Friburgo, Rua Dr. Sílvio Henrique Braune 22, Centro, Nova Friburgo, RJ 24020-420, Brasil. E-mail: elancardozo@gmail.com

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 incerta. 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 (Willard & Fossum 2005), 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, cães pastores de Shetland e Cocker spaniels são mais acometidos (Worley et al. 2004), assim como raças pequenas como Schnauzer (Mehler & Bennett 2006). 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 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 colecitocentese 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 (Houwers & Blankenshtein 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 natural por *C. guttulatus* associado à colangite e colangiohepatite em três cães.

HISTÓRICO

Três cães foram atendidos no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária (CTIVet), localizado na Barra da Tijuca, município do Rio de Janeiro, RJ; uma cadela com 13 anos da raça Schnauzer e os outros 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, de diarreia há 15 dias, prostrado, dispneico, fraqueza muscular presente e com 11,6 kg de peso vivo. Ao exame clínico apresentava aumento abdominal sugestivo de ascite, temperatura retal de 37,8°C; 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 da mucosa oral, taxa de desidratação em torno de 6%.

Caso 2

Portador de insuficiência cardíaca congestiva, hiperadrenocorticismismo, doença periodontal, gengivite, halitose intensa, eventuais episódios de vômitos e com 14 kg de peso vivo. Ao exame clínico apresentava temperatura retal de 38,8°C; 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.

Caso 3

Anorético há dois dias, prostrado, dispneico, com 7,5 kg de peso vivo. Ao exame clínico apresentava aumento abdominal localizado na região hepática, temperatura retal de 38,8°C; frequência cardíaca de 128 batimentos por minuto, frequência respiratória de 40 movimentos por minuto, pulso arterial de apresentação intensa; tempo de preenchimento capilar de 2 segundos.

Com o intuito de diagnóstico, foi solicitado exame de imagem ultrassonográfico do abdômen, 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 CTTVet, 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 x 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), Gama-glutamil 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 a determinação da albumina (g/dL).

Amostras de fezes foram coletadas e examinadas com a utilização da técnica de centrifugo-flutuação com solução saturada de açúcar (Birgel et al. 1977). Nas fezes de dois animais (1 e 2), foram observadas células leveduriformes cilíndricas, isoladas ou em

pequenas cadeias com morfologia semelhante ao do gênero *Cyniclomyces* (Figura 1a), indicando a necessidade de coleta de material estomacal, devido ao fato de *C. guttulatus* estar associado à gastroenterite em cães. Através de lavado gástrico, utilizando sonda nasogástrica número 8, seringa de 60 mL e solução fisiológica a 0,8%, sem necessidade de medicação pré-anestésica foi coletado material que no exame direto foi observado células leveduriformes cilíndricas em pequenas cadeias com morfologia

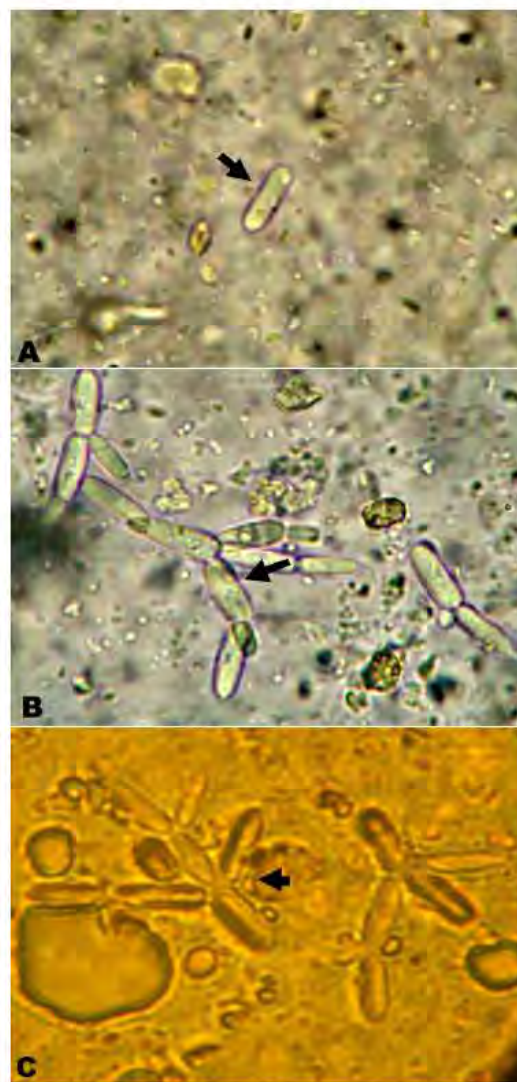


Figura 1. *Cyniclomyces guttulatus* (→) observado nas fezes (a), lavado gástrico a fresco (b) e em meio de cultura YPGA (c) 400X.

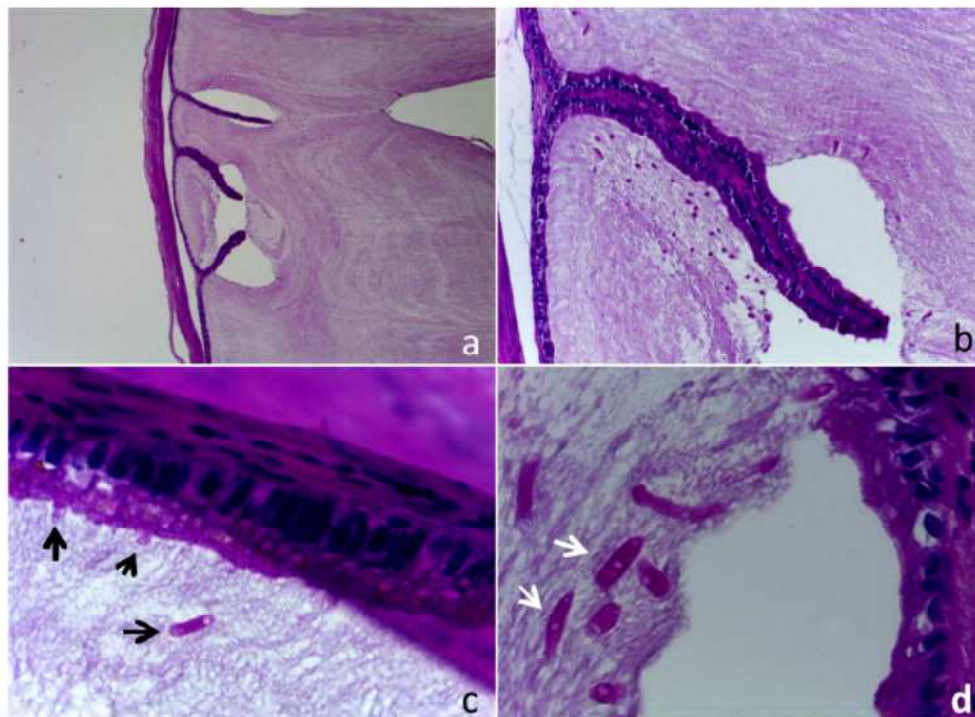


Figura 2. Vesícula biliar de cão: mucosa com pseudovilosidades (a) 40X; formas vegetativas no entorno da pseudovilosidade (b) 200X; células vegetativas de *Cyniclomyces guttulatus* na superfície da mucosa e sedimento (→) (c) 1000X; e, em maior número, no sedimento (⇨) (d) 1000X. H.E.

gia semelhante ao do gênero *Cyniclomyces* (Figura 1b). As amostras coletadas foram devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas e, imediatamente, levadas para o Laboratório de Coccidios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. Amostras do conteúdo estomacal foram coradas a fresco, entre lâmina e laminula, 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). Além disso, foram obtidas colônias isoladas do material fecal de coloração ambar ao marrom em meio YPGA (Figura 1c), com características próprias (cheiro e forma) de *C. guttulatus* (Flausino et al. 2012). Preparados, entre lâmina e laminula, de colônias isoladas, suspensas em solução salina a 0,85% e coradas pelo azul de algodão lactofenol mostraram células com morfologia semelhante a do

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

Parâmetros	Valores em mg/dL						Referência ^a
	Caso 1 Avaliações ^a		Caso 2 Avaliações		Caso 3 Avaliações		
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	
Albumina	2,10	2,8	^c	-	3,7	2,2	2,8
ALT (TGP)	246	77,9	43,9	<0,5	71,7	473	C<89
Bilirrubina Total	4,48	<0,5	-	272	0,3	0,3	C<0,5
Fosfatase Alcalina	1420	114	132	72,1	1310	3900	C<164
Uréia	84,9	72,1	33,6	<0,5	88,6	-	C<54
Gama GT	17,3	16,0	-	65,8	<5,0	251	C<20

^a Antes e após tratamento com fluconazol 5mg/kg de peso vivo

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

^c Não avaliado (-)

gênero *Cyniclomyces*. No caso 3, após a remoção cirúrgica da vesícula biliar, fragmentos da mesma foram fixados em formol histológico, emblocados em parafina e, mais tarde, corados em Hematoxilina e Eosina. Na Figura 2 podem-se observar as pseudovilosidades na mucosa da vesícula biliar e, a presença de células vegetativas de *C. guttulatus* agrupadas em meio ao sedimento localizado sobre a superfície da mucosa e no muco biliar.

DISCUSSÃO

Nos três animais desse estudo foram isolados do lavado gástrico, fezes (exceção do animal 3), bile e visualizado no corte histológico da mucosa da vesícula biliar o ascomiceto *C. guttulatus*, que esteve associado aos sinais clínicos caracterizados por vômito e diarreia a semelhança do que foi assinalado por Houwers & Blankenstein (2001), Gjerde et al. (2009), Dijkstra et al. (2010) e Flausino et al. (2012). Além disso, o animal do caso 2 apresentava imagem ultrassonográfica sugestiva de gastrite e com a observação de grande quantidade de cadeias longas deste ascomiceto, formando pseudo-hifas no lavado gástrico semelhante à descrição prévia de Flausino et al. (2012). O animal do caso 3 apresentava imagem ultrassonográfica sugestiva de colangite, com grande distensão da vesícula biliar e mucocele severa.

Os resultados laboratoriais foram sugestivos para doença hepatobiliar com aumento da atividade de transaminases parenquimatosas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase) animais 1 e 2 e enzimas colestáticas (fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase) (Center 2009) e no exame de imagem ultrassonográfico, principal para o diagnóstico de alterações da vesícula biliar (Willard & Fossum 2005, Romero et al. 2008). Além disso, foi observada a presença de sedimento biliar com mucocele, visto que os três animais do presente estudo tinham idade entre 13 e 17 anos, de porte médio a semelhança dos achados de Neer (1992) e Worley et al. (2004) para animais mais velhos e, corroborando com os sinais clínicos observados por Slatter (1998) e Willard & Fossum (2005). Pode ser difícil compreender as diferenças entre lama biliar e mucocele no exame ultrassonográfico. Lama biliar é móvel, enquanto que mucocele é imóvel e exibe um padrão distinto estriado ou estrelado (Besso et al. 2000), citação esta observada na vesícula biliar dos casos 1 e 3 após colecistectomia respectivamente.

O procedimento instituído para tratar os processos patológicos induzidos pelo ascomiceto, que se

manifestaram por episódios de vômito, diarreia (Houwers & Blankenstein 2001, Gjerde et al. 2009, Dijkstra et al. 2010, Flausino et al. 2012,) e colangite (Neel & Tarigo 2006), foi com antifúngico sistêmico, 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 para cães e gatos é de 50.000 UI/kg, via oral a cada 24 horas por 4 dias (Peters & Houwers 2009) ou de 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). Apesar de *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, e *Clostridium* serem comuns (Wagner et al. 2007), não havia envolvimento bacteriano nos três casos observados, a não ser a presença de *C. guttulatus*, caracterizando como colangite exclusivamente em decorrência de um único agente etiológico. Segundo Neel et al. (2006), há necessidade que haja a presença de um agente etiológico para que ocorra colangite clínica.

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. Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, São Paulo, 1977. 218p.
- Burrows C.F., Batt R.M. & Sherding R.G. Diseases of the small intestine, p.1169-1232. In: Ettinger S.J. & Feldman E. (Eds), *Textbook of veterinary internal medicine*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1995.
- 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. Proteinlosing enteropathy in Rottweilers. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 135:406-412, 2010.

- Ettinger S.J. *Manual de medicina Interna Veterinária*, 1ª ed., Editora Manole, São Paulo, 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 ventrikkelog 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*. 11th Ed. Elsevier Inc., Philadelphia, 2006. p.802-804.
- Hersey-Benner C. Diarrhea in a rabbit. *Cyniclomyces guttulatus* yeast. *Lab. Anim.*, (NY) 37:347-349, 2008.
- Houwens D.J. & Blankenstein B. *Cyniclomyces guttulatus* (Brillendoosjes-gist) endiarree bij honden. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 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. CABI, Wallingford, 2008. p.1-746.
- Martínez Romero G., García Ortuño L.E., Casas F.C., Solís Carvajal K. & Méndez Aguilar R.E. Mucocoele 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*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 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, p.154-156. In: Kurtzman C.P. & Fell J.W. (Eds). *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1999.
- Pike F.S., Berg J., King N.W., Penninck D.G. & Webster C.R.L. Gallbladder mucocoele in dogs: 30 cases (2000-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 224:1615-1622, 2004.
- Quinn R. & Cook A.K. An update on gallbladder mucocoeles in dogs. *Vet. Med.*, 103:169-175, 2009.
- Richle R. & Scholer H.J. *Saccharomycopsis guttulata* Von Kanmchen: Kulturelle Eigenschaften Und Mögliche Bedeutung. *Path. Microbiol.*, 24:783-793, 1961.
- Rippon J.W. *Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 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. (Eds), *As bases farmacológicas da terapêutica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1987.
- 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. (Eds), *Manual Saunders de clínica de pequenos animais*. 3ª ed., Editora Rocca, São Paulo, 2008.
- Slatter D. Fígado e Sistema Biliar, p.783-798. In: Slatter D. (Ed.), *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2ª ed., Manole, São Paulo, 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. (Eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6th ed., Elsevier, St. Louis, 2005.
- Worley D.R., Hottinger H.A. & Lawrence H.J. Surgical management of gallbladder mucocoeles in dogs: 22 cases (1999-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 225:1418-1422, 2004.
- Zierdt C.H., Detlefson C., Muller J. & Waggle K.S. *Cyniclomyces guttulatus* (*Saccharomycopsis guttulata*)-culture, ultrastructure and physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54:357-366, 1988.

Anexo 8.3. FLAUSINO, G.;FURTADO, T.T.; McINTOSH, D.; TEIXEIRA FILHO, W.L. Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus *Coccidia*, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2013.

Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus

Gilberto Flausino | Tassia Torrcs Furtado | Douglas McIntosh | Walter Leira Teixeira Filho

Submitted in 10.11.2013

Accepted in 22.11.2013

Abstract Flausino G, Furtado TT, McIntosh D, Teixeira Filho WL. 2013. **Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus** [Diagnóstico diferencial entre estágios endógenos de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus]. *Coccidia* 1, 21-24. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: gilflausino@ufrj.br

In the intestinal microbiota of Guinea pigs *Cavia porcellus* Linnaeus there exists a wide variety of species that may be pathogenic or non-pathogenic; including the ascomycete, *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and the coccidium, *Eimeria caviae* Sheather, 1924, both observed in the digestive tract of *C. porcellus*. This study aimed to compare the developmental stages of gastrointestinal *C. guttulatus* with *E. caviae* present in guinea pigs derived from rustic breeders, to allow their differential diagnosis between them. Three Guinea pigs naturally infected with *C. guttulatus* were infected with 10^6 oocysts of *E. caviae*. Mucosal swabs stomach, small intestine and large intestine were stained by Giemsa and Ziehl-Neelsen staining, respectively, for the identification of endogenous forms of *C. guttulatus* and *E. caviae*, respectively. Assessment of the differences between endogenous stages of *E. caviae* and *C. guttulatus* was markedly more difficult

than the straight forward comparison of merozoites of the coccidia with vegetative cells of the ascomycete. Polymorphism was observed in *C. guttulatus* which complicated comparison to the first and second generations of merozoites of *E. caviae* present in smears of the large intestine of Guinea pigs. Based on the results obtained it was concluded that the endogenous forms of *C. guttulatus*, characterized as small vacuolated cells, and merozoites of *E. caviae* should be examined carefully to avoid mistakes in diagnosis.

Keywords oocysts, morphology, diagnosis, Ascomycota, Apicomplexa

Resumo Na microbiota intestinal de cobaias *Cavia porcellus* Linnaeus existe uma grande variedade de espécies que podem ser patogênicas ou não, como o ascomiceto, *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and

G Flausino ✉

Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: gilflausino@ufrj.br

TT Furtado

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: tassia@ufrj.br

D McIntosh | WL Teixeira Filho

Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: mcintosh@ufrj.br
leira@ufrj.br

Scott, 1971 e o coccídio, *Eimeria caviae* Sheather, 1924, ambos observados com certa frequência no sistema digestório de *C. porcellus*. O presente trabalho teve como objetivo comparar as fases de desenvolvimento gastrintestinais de *C. guttulatus* com as de *E. caviae* procedentes de criações rústicas de cobaias, traçando um diagnóstico diferencial entre as mesmas. Três cobaias naturalmente infectadas com *C. guttulatus* foram infectados com 106 oocistos esporulados de *E. caviae*. Esfregaços com mucosas estomacal, de intestino delgado e de intestino grosso foram coradas pelos métodos de Giemsa e Ziehl-Neelsen, respectivamente, para a identificação das formas endógenas de *C. guttulatus* e *E. caviae*. A dificuldade em avaliar as diferenças entre as formas endógenas de *E. caviae* e as de *C. guttulatus* foi mais acentuada quando comparou-se os merozoítas deste coccídio com as células vegetativas do ascomiceto. Acentuado polimorfismo pode ser observado em *C. guttulatus* quando comparados aos merozoítas de *E. caviae* em esfregaços de intestino grosso. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que as formas endógenas de *C. guttulatus* caracterizadas como células vacuoladas pequenas e merozoítas de *E. caviae* são as que devem ser analisadas criteriosamente para que não haja equívoco no diagnóstico diferencial.

Palavras-chave oocistos, morfologia, diagnóstico, Ascomycota, Apicomplexa

Introduction

In the intestinal microbiota of Guinea pigs *Cavia porcellus* Linnaeus there exists a wide variety of species, both pathogenic or non-pathogenic, including some which, although classified in different Kingdoms, share developmental stages with similar morphologies. Among them, an ascomycete, *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and the coccidium, *Eimeria caviae* Sheather, 1924, have both been observed in the digestive tract of *C. porcellus*.

Oftentimes, the differential diagnosis between one or more etiological agents is essential to determine the responsible for the disease process, be it infectious, nutritional, or a combination of both. The association of nutri-

tional factors to infectious agents has been pointed out by Scrimshaw et al. (1959), who affirmed the existence of this interaction. Moreover, the differential diagnosis of microorganisms is essential to determine their role in the disease process. Costa et al. (2001) observed morphological similarities between *C. guttulatus* cells and zoites of coccidian, in Geisma stained mucosal scrapings of rabbits. Subsequently, Van Praag (2009) commented on the difficulty of separating different forms of *C. guttulatus* from coccidial development stages, in rabbits with coccidiosis. However, these two studies did not address the issue of how to differentiate between the numerous developmental stages of these organisms that may result in confounding during evaluation of outbreaks of coccidiosis. It should also be considered that *C. guttulatus* has been reported as being pathogenic in dogs (Flausino et al. 2012, Furtado et al. 2013), and therefore it is important to correctly determine the morphological forms of all developmental stages, to ensure effective differential diagnosis. Thus, this study aimed to compare the developmental stages observed in the gastrointestinal mucosa of guinea pigs derived from rustic breeding facilities.

Materials and methods

Three Guinea pigs derived from a rustic breeding facility located in the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil were used to obtain *C. guttulatus* and *E. caviae* were used three Guinea pigs coming from a rustic breeding located in the Municipality of Seropédica in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

The Guinea pigs were transported to the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ), and were reared and fed in a single cage without the administration of anticoccidial medication. Feed and water were administered *ad libitum*.

Animals infection

The Guinea pigs from the rustic breeding were positive by microscopy for *C. guttulatus* but they were negative for *E. caviae*. Thus, an inoculum for experimental infection was produced by recovering and isolating oocysts

from fecal samples of positive Guinea pigs by flotation in Sheather's sugar solution (S.G. 1.20) according to the protocol of Duszynski & Wilber (1997). The oocysts were preserved in a 2.5% (w/v) solution of $K_2Cr_2O_7$ to induce sporulation and maintained in a refrigerator (2–5 °C) until use. Three Guinea pigs were inoculated, using inocula, quantified using a Neubauer chamber, containing approximately 100 sporulated oocysts of *E. caviae*.

Necropsy of the animals

After confirming that the three animals eliminated oocysts of *E. caviae* in their feces, a single animal was randomly selected to be euthanized in CO_2 chamber, as recommended by Cobea (2013). Upon confirmation of death, the animal was placed in the supine position and incised in the mento-pubic direction to expose the thoracic-abdominal cavity and for removal of the digestive tract. Thereafter, the tract was divided into stomach, small intestine and large intestine. Mucosal scrapings from each section were made with the aid of a glass slide for preparation of smears. Smears were air dried and dehydrated in methanol for 5 minutes. In parallel to this activity, fragments of these segments were adhered to a piece of porous paper by the serosal side, and placed in a flask containing 10% formalin for histological fixation.

Laboratorial analysis

Mucosal scrapies

Smears originating from each segment were stained with Giemsa or Ziehl-Nielsen (Behmer et al. 1976). The identification of endogenous forms of *C. guttulatus* and *E. caviae* was conducted using a binocular microscope (Carl Zeiss; Germany) at 400X and 1000X magnification.

Photographs

Photomicrographs were produced using a binocular microscope model star Primo, Zeiss (Germany) coupled to a digital camera model Panasonic Lumix F2 ® (Japan).

Statistical analysis

The Student's *t* test was used to compare

measurements of the length, width and shape-index. The software Microsoft ® Excel 2007 was used to calculate the mean, variance, degree of freedom and *p* value (Sampaio 2002).

Results and discussion

The difficulty in assessing the differences between the endogenous forms of *E. caviae* and *C. guttulatus* becomes more pronounced when coccidian merozoites are compared with vegetative cells of the ascomycete (Figure 1, Table 1).

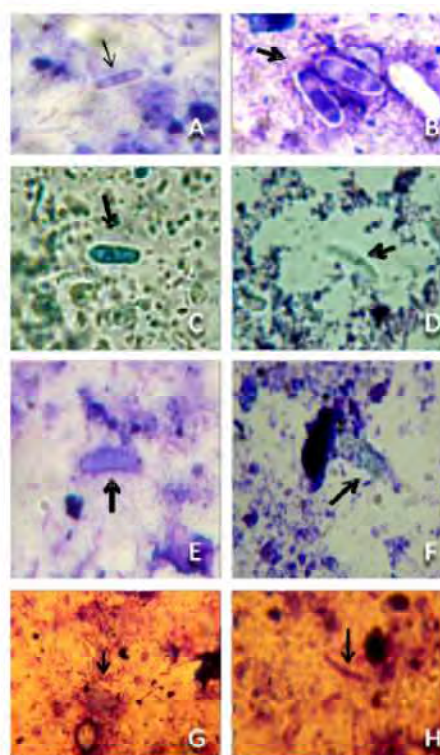


Fig. 1. Comparative aspects between the intestinal stages of *Cyniclomyces guttulatus* and *Eimeria caviae* (arrows) from a Guinea pig *Cavia porcellus*. Small (A, C) and large (B, D) vegetative cells of *C. guttulatus* stained with Giemsa (A, B) and Ziel-Nielsen (C, D). Macromerozoites (E, G) and micromerozoites (F, H) of *Eimeria caviae* stained with Giemsa (E, F) and Ziel-Nielsen (G, H). Magnification of 1000X (A-F, H) and 400x (G).

Strong polymorphism was observed in *C. guttulatus* which complicated differentiation

Table 1. Comparative aspects of free living forms in the large intestine of a Guinea pig *Cavia porcellus*

Species (n= 10)	Forms ^a	Diameters (µm)	
		length	width
<i>Cyniclomyces guttulatus</i> (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971	Large vegetative cells	15.91 ^z (18.7-13.86)	4.22 ^y (7.92-5.50)
	Small vegetative cells	10.89 ^w (14.08-9.24)	3.19 ^z (4.18-2.42)
	Macromerozoites	12.85 ^k (14.96-10.12)	3.10 ^y (3.96-2.42)
<i>Eimeria caviae</i> Sheather, 1924	Micromerozoites	8.58 ^w (9.46-6.38)	2.51 ^z (2.86-1.98)

^aGiemsa stain^bSame letters in each column significant at p <0.001 by Student's t test

from first and second generation merozoites from smears of the large intestine. The basis for these difficulties was revealed by morphometric analysis of the different morphological forms (Table 1). Specifically, it was noted that once the mean measurements were equivalent between small vegetative cells and micromerozoites; and between large vegetative cells and macromerozoites.

Observations similar to those encountered in the current work, were reported by da Costa et al. (2001), who highlighted the marked similarity between vegetative cells of *C. guttulatus* and zoytes of coccidia (*Cystoisospora felis*,) found in the Peyer's patches of experimentally infected rabbits. Furthermore, Van Praag (2009), emphasized the difficulties encountered for distinction between vegetative cells of *C. guttulatus* containing vesicles and oocysts of *Eimeria* in rabbits with coccidiosis.

Based on our data it can be concluded that the endogenous forms of *C. guttulatus* and *E. caviae*, in particular the developmental stages of small vacuolated cells and merozoites respectively, should be examined carefully to avoid possible mistakes in diagnosis.

References

- Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AG. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976.
- da Costa PS, Lopes CWG, de Carvalho ECQ. Patologia comparativa na infecção experimental por *Cystoisospora felis* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em coelhos tipo carne. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 23, 215-218, 2001.
- Flausino G, Baroni FA. Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971) in Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 31, 100-103, 2009.
- Flausino G, Leal PDS, McIntosh D, Amaral LG, Teixeira Filho WL Flausino W, Lopes CWG. Isolation and Characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in dogs in Brazil. *Current Microbiology*, 65, 542-546, 2012.
- Furtado TT, Flausino G, Leal PDS, Ferreira JP, McIntosh D, Flausino W, Teixeira-Filho WL, Paes-de-Almeida EC, Lopes CWG. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35, 1-6, 2013.
- Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002.
- Scrimshaw NS, Taylor CE, Gordon JE. Interactions of nutrition and infection. *American Journal of Medical Science*, 237, 367-403, 1959.
- Van Praag E. Enterits protozoal: coccidiosis. http://www.medirabbit.com/EN/GI_diseases/Protozoal_diseases/Cocc_en.htm [18-10-13].