

Detección de *Rhodotorula sp.*, un potencial patógeno oportunista, en la mucosa nasal de cuyes (*Cavia porcellus*)

Lenys Buela^{1*}; Juan Barrezueta²; Silvia Torres³; María Guamán⁴; Maritza Martínez⁵

(Recibido: febrero 06, 2024, Aceptado: mayo 15, 2024)

<https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol8iss14.2024pp40-48p>

Resumen

Cepas de levaduras del género *Rhodotorula* pueden causar graves infecciones en humanos, pero también colonizan a animales domésticos o de granja, que actúan como reservorios de estos microorganismos. El contacto desprevenido con dichos animales puede causar enfermedades zoonóticas. En este trabajo se reporta el aislamiento fortuito de una cepa de *Rhodotorula sp.* a partir de la mucosa nasal de cuyes domésticos (*Cavia porcellus*) criados para consumo humano, en la Provincia de Cañar, Ecuador. La caracterización de la cepa permitió comprobar que la misma expresa algunos factores de virulencia, como la producción de fosfolipasas y hemolisinas; además, la cepa resultó resistente a tres antifúngicos de uso terapéutico: fluconazol, voriconazol y miconazol. La secuenciación y análisis bioinformático de la región ITS de esta cepa permitió establecer que está relacionada filogenéticamente con cepas de *Rhodotorula taiwanensis* y *R. glutinis*, ambas especies señaladas como patógenos oportunistas del ser humano. La presencia de este tipo de cepas de microorganismos potencialmente patógenos, en los tejidos de cuyes criados con fines de consumo, debe considerarse con detenimiento, pues podrían representar señales de alarma que requieran de una mayor vigilancia.

Palabras Clave: *Cavia porcellus*; cobayos; infección oportunista; *Rhodotorula*; Zoonosis.

Detection of *Rhodotorula sp.*, a potential opportunistic pathogen, in the nasal mucosa of guinea pigs (*Cavia porcellus*)

Abstract

Strains of *Rhodotorula sp.*, a group of yeasts considered as opportunistic pathogens, can cause serious infections in humans. Some of these species also colonize domestic or farm animals, which act as reservoirs for these microorganisms. Inattentive contact with such animals can cause zoonotic diseases. In this work we report the fortuitous isolation of a strain of *Rhodotorula sp.* from the nasal mucosa of domestic guinea pigs (*Cavia porcellus*), reared for human consumption in the province of Cañar (Ecuador). The characterization of the strain showed that it expresses some virulence factors, such as the production of phospholipases and hemolysins; in addition, the strain was resistant to three antifungals of therapeutic use: fluconazole, voriconazole and miconazole. Sequencing and bioinformatic analysis of the ITS region of this strain allow us to established that it is phylogenetically related to strains of *Rhodotorula taiwanensis* and *R. glutinis*, both species identified as opportunistic human pathogens. The presence of potentially pathogenic strains of microorganisms in the tissues of guinea pigs raised for consumption should be carefully considered, as they could represent alarm signals that require greater vigilance.

Keywords: *Cavia porcellus*; guinea pigs; opportunistic pathogen; *Rhodotorula*; Zoonoses.

¹ Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Salud y Bienestar. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: lbuelas@ucacue.edu.ec; lenysbuela@gmail.com. ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4635-8588>. *Autor de correspondencia

² Graduado Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Salud y Bienestar. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: jsbarrezuetav04@est.ucacue.edu.ec, ORCID <https://orcid.org/0000-0003-4287-1106>.

³ Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Salud y Bienestar. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: storress@ucacue.edu.ec ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4094-5522>.

⁴ Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Salud y Bienestar. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: maria.guaman@ucacue.edu.ec. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3856-4536>

⁵ Carrera de Bioquímica y Farmacia, Unidad Académica de Salud y Bienestar. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: maritza.martinez@ucacue.edu.ec. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1094-5847>.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Rhodotorula* pertenecen al phylum *Basidiomycota* y están ampliamente distribuidas en ambientes naturales tales como océanos, lagos y suelos ⁽¹⁻⁴⁾. Se trata de hongos levaduriformes que producen carotenoides y, por tal razón, sus colonias manifiestan un característico color rosado ^(4,5). Ocho especies conforman este género, de las cuales tres (*R. mucilaginosa*, *R. glutinis* y *R. minuta*) son conocidos patógenos oportunistas, que han sido aislados partir de humanos y animales enfermos ^(1, 4, 6-11).

Entre los factores de virulencia que expresan las especies de este género destacan la producción de fosfolipasas y proteasas ⁽¹¹⁾. En ocasiones, las especies oportunistas presentan resistencia a algunos compuestos antifúngicos con uso terapéutico ^(7,11); otras cepas son capaces de multiplicarse a 37°C, formando biopelículas, un aspecto crucial en la patogénesis de las infecciones causadas por hongos levaduriformes. En vista de que las especies de este género poseen una versatilidad metabólica muy amplia, lo cual les permite adaptarse a diferentes condiciones medioambientales y colonizar diversos ecosistemas, algunas de ellas son capaces de colonizar humanos y otras especies animales ^(1,5,12-18). De allí que el número de reportes de infecciones causadas por especies del género *Rhodotorula* vaya en aumento ^(1,19).

Cepas pertenecientes a especies del género *Rhodotorula* también se han encontrado en tejidos de animales y pájaros, aparentemente sanos, como gatos ⁽¹³⁾, monos Rhesus ⁽¹⁴⁾, camellos ⁽¹⁵⁾, avestruces ⁽²⁰⁾, palomas ⁽²¹⁾ y halcones ⁽²²⁾. En ocasiones, esta colonización deriva en infecciones con manifestaciones clínicas relevantes ⁽⁸⁻¹⁹⁾. Es por ello que se ha considerado que muchos de estos animales actúan como reservorios de cepas de *Rhodotorula spp.*, potencialmente patógenas para los seres humanos.

En un reciente estudio de la microflora que coloniza la cavidad nasal de cuyes domésticos (*Cavia porcellus*) criados para consumo humano en granjas del Cantón Biblián (Provincia de Cañar, Ecuador), aislamos por azar una cepa del género *Rhodotorula*. En el presente trabajo, presentamos la caracterización fenotípica

de esta cepa y su identificación molecular preliminar, destacando su posible rol como potencial patógeno para los seres humanos.

METODOLOGÍA

Cepas microbianas

Estudio de tipo observacional y descriptivo. El aislado de *Rhodotorula sp.* se obtuvo según el procedimiento descrito por Buela et al. ⁽²³⁾. En breve, las muestras de mucosa nasal de cuyes adultos sanos se colectaron utilizando hisopos de algodón estériles, humedecidos previamente con solución salina estéril. Los hisopos se emplearon para inocular medio Hi-Crome Candida Differential Agar (HiMedia Laboratories, India), incubándose posteriormente a 30°C hasta aparición de colonias. Las mismas fueron subcultivadas varias veces hasta su purificación, y se identificaron mediante métodos moleculares (véase más adelante). Los aislados se almacenaron en agua destilada a temperatura ambiente, en la oscuridad, y se reactivaron en placas de Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) (Difco Laboratories, EEUU). Como referencia empleamos la cepa ATCC 90028 de *Candida albicans* en distintos experimentos.

Producción de fosfolipasas

La producción de fosfolipasas se ensayó utilizando la placa de agar yema de huevo de huevo que contenía 1 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂ y un 8% de emulsión estéril de yema de huevo ⁽²⁴⁾. Suspensiones de levaduras (106 ml-1) levaduras de cada aislado, previamente cultivadas en ASD durante dos días se inocularon en la superficie del medio de placa de agar de yema de huevo y se incubaron a 37°C durante siete días. La hidrólisis de los sustratos lipídicos presentes en la yema de huevo da lugar a la formación de un complejo de calcio con ácidos grasos liberados por la acción de las enzimas secretadas, dando lugar a una zona de precipitación alrededor de la colonia.

Producción de hemolisinas

La actividad hemolítica de las cepas de levaduras se evaluó utilizando ASD suplementado con 6% de sangre humana y 3% de glucosa (pH 5.6) ⁽²⁵⁾. Alícuotas de 10 µL de una suspensión de levaduras se inocularon por duplicado en el medio, el cual se incubó a 37°C durante 2 y 5

días, respectivamente. Al final de la incubación, la presencia de un halo translúcido alrededor de las colonias se consideró como indicador de actividad hemolítica positiva.

Producción de proteasas extracelulares

La actividad proteolítica se determinó por el método descrito por Deorukhkar et al.⁽²⁶⁾, con ligeras modificaciones. Se utilizó un medio compuesto por ASD y leche desnatada reconstituida al 1%. La leche fue calentada a 90°C durante 60 minutos y agregada al agar SD antes de verter el medio en placas de Petri. A continuación, depositamos alícuotas de 10 µL de suspensiones de cada una de las cepas de levaduras, e incubamos a 30°C por un mínimo de 48 horas. La actividad proteolítica de los cultivos se examinó diariamente durante 6 días. La presencia de un halo claro alrededor de las colonias se consideró positiva para la actividad.

Crecimiento invasivo

Alícuotas de 10 µL de cada una de las cepas se depositaron sobre la superficie de ASD, se incubaron a 30 °C durante 3 días y luego se dejaron a temperatura ambiente durante 2 días (27). Para remover el crecimiento superficial, las colonias fueron lavadas con un chorro suave de agua desionizada, tras lo cual las placas se fotografiaron. Con la ayuda de un bisturí, se cortaron láminas delgadas de bloques de agar que contenían los restos de las colonias, y se observaron al microscopio (a 10 y 40 X), con el fin de registrar la penetración de las células por debajo de la superficie del agar.

Susceptibilidad a compuestos antifúngicos

La susceptibilidad a cuatro fármacos antifúngicos se determinó mediante la técnica de difusión en disco o método de Kirby-Bauer, de acuerdo con el CLSI⁽²⁸⁾. El ensayo se realizó en placas de agar Mueller-Hinton (MHA), suplementadas con un 2% de glucosa y 0,5 µg ml⁻¹ de azul de metileno. Los antifúngicos probados fueron fluconazol (25 µg), miconazol (50 µg), ketoconazol (10 µg) (Liofilchem S.R.L., Rosetto degli Abruzzi, Italia), e itraconazol (10 µg) (Bioanalyse, Ankara, Turquía). El diámetro de la zona de inhibición de cada antifúngico se midió con un Vernier y se comparó con los valores reportados en el manual del CLSI⁽²⁸⁾.

Identificación molecular

La extracción del ADN de las levaduras se realizó según el método de ebullición rápida de descrito por Almeida da Silva et al.⁽²⁹⁾. La identificación de la especie se realizó mediante la amplificación, secuenciación y análisis del transcrito interno espaciador (ITS) del ADNr. Para ello, se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')^(30,31). La mezcla de PCR mezcla contenía 25 µL de premezcla (DreamTaq Green PCR Mastermix, ThermoScientific), 19 µL de agua estéril desionizada, 2 µL de cada cebador, y 2 µL de ADN genómico, en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron: una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, recocido a 58°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 min, y una fase final de extensión a 72°C durante 10 min.

Los amplicones fueron secuenciados por Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos, mediante el empleo de la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La cepa se identificó en base a la mayor puntuación de identidad, y se depositó en GenBank.

El análisis filogenético fue realizado con MEGA X⁽³²⁾ empleando el método de Neighbor-Joining⁽³³⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los distintos morfotipos de colonias de levaduras que se aislaron a partir de mucosa nasal de cuyes domésticos, uno (denominado PCE3) captó nuestra atención debido a su pigmentación rosada en ASD y Hi-Chrome Candida Differential Agar (Figuras 1A y 1B).

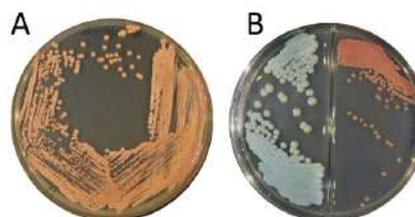


Figura 1. Aspecto de colonias de la cepa PCE3 en medio Agar Sabouraud Dextrosa (A) y Hi-Chrome Candida Differential Agar (B). Las colonias del lado izquierdo de la placa mostrada en (B), corresponden a la cepa ATCC 90028 de *Candida albicans*.

Los blastoconidios de este aislado, vistos al microscopio, presentaron una morfología ovoide y la presencia de las gemaciones características de las especies del género *Rhodotorula* (Figuras 2A y 2B).

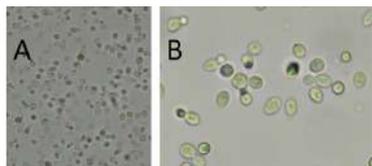


Figura 2. Morfología de los blastoconidios de la cepa PCE3. La imagen en (A) fue tomada con aumento de 40X; la imagen en el panel (B) es una magnificación de la imagen anterior.

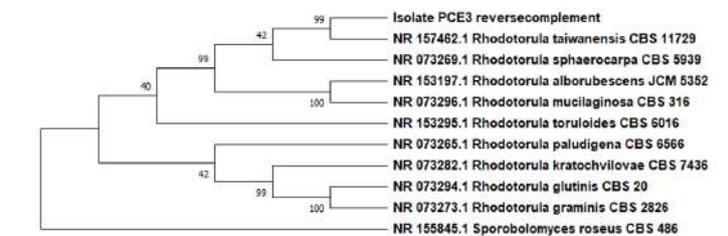


Figura 3. Historia evolutiva de la cepa PCE 3, deducida mediante el método Neighbor-Joining, empleando el programa MEGA X. La cepa CBS 486 de *Sporobolomyces roseus* se incluyó como grupo externo para enraizar el árbol filogenético.

R. taiwanensis es una especie muy cercana, filogenéticamente, a *R. mucilaginosa* y *R. glutinis*, dos especies consideradas como patógenos humanos oportunistas⁽³⁴⁻³⁶⁾. Cepas pertenecientes a esta especie han sido identificadas en el microbioma de la piel de pacientes con esclerosis sistémica difusa, en una proporción muy elevada, lo cual sugiere su posible participación en la activación de la respuesta inflamatoria característica de esta enfermedad⁽³⁷⁾. Otras cepas de *Rhodotorula spp.*, que se aíslan frecuentemente a partir de muestras ambientales, así como de tejidos y órganos de animales, también se consideran patógenos potenciales⁽⁴⁾.

Los ensayos orientados a determinar la expresión de distintos factores de virulencia en esta cepa permitieron detectar la producción de fosfolipasas y hemolisinas (Figuras 4A, B); sin embargo, la cepa PCE3 no produce proteasas capaces de degradar la caseína. En cuanto a su capacidad de penetrar sustrato, el ensayo realizado mostró que es escasa, aunque no inexistente (Figuras 4C, D). En las imágenes de microscopía óptica se observa claramente

La secuenciación de la región ITS de este aislado, y su posterior análisis mediante métodos bioinformáticos, permitió establecer que está filogenéticamente relacionado con la cepa CBS 11729 de la especie *Rhodotorula taiwanensis* (99.31% de identidad, 97% de cobertura y un valor E de 0.0) y con la cepa CBS 316 de *R. mucilaginosa* (94.43% de identidad, 95% de cobertura y un valor E de 0.0). Esta estrecha relación filogenética se observa claramente en la Figura 3. El código de acceso asignado a esta secuencia de la cepa PCE3 en GenBank fue ON706054.

que unas pocas levaduras fueron capaces de penetrar activamente el sustrato, en forma de pequeños cúmulos.

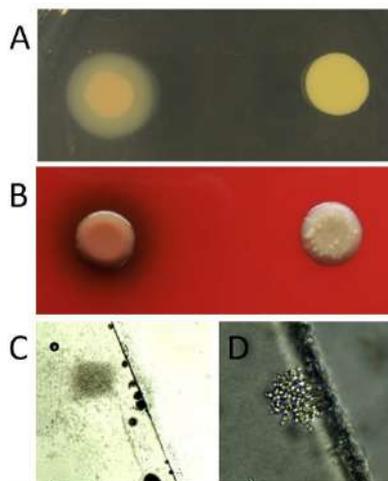


Figura 4. Factores de virulencia expresados por la cepa PCE 3 de *Rhodotorula sp.* (A) Producción de fosfolipasas (halo de precipitación) (izq: PCE3; der: *C. albicans*); (B) Producción de hemolisinas (halo de hemólisis) (izq: PCE3; der: *C. albicans*); (C) Ensayos de penetración (visualizado con aumento de 10X); (D) Ensayo de penetración (visualizado con aumento de 40X). Los pequeños cúmulos de células que se observan por debajo de la superficie del medio agarizado (lado izquierdo en las imágenes) corresponden a grupos de levaduras que lograron penetrarlo activamente.

Son escasas las referencias sobre la patogenicidad de cepas de *Rhodotorula* en especies animales. Entre ellas, destacan dos estudios: el primero se refiere a un brote de infecciones cutáneas en pollos⁽³⁸⁾, mientras que el segundo describe una infección pulmonar en ovejas⁽³⁹⁾, ambas causadas por *R. mucilaginosa*. También se ha reportado sobre infecciones causadas por especies del género *Rhodotorula* en leones marinos, perros, gatos, vacas lecheras y avestruces, entre otros^(10,40-43). Nuestros resultados se suman a los anteriores, y muestran la presencia de una especie del género *Rhodotorula* en la mucosa nasal de cuyes, aparentemente sanos.

Aunque la cepa PCE3 no produce proteasas extracelulares, la producción de fosfolipasas y hemolisinas pueden considerarse como señales de alarma, toda vez que se trata de enzimas implicadas en procesos de patogénesis⁽⁴⁴⁾. Las fosfolipasas, por ejemplo, degradan el componente fosfolipídico de las membranas celulares, causando la lisis celular y favoreciendo la diseminación de las levaduras a través de tejidos y órganos. Por su parte, las hemolisinas degradan el componente celular de la sangre, lo cual le permite a las levaduras patógenas adquirir hierro, a partir de la degradación de la hemoglobina del hospedador, lo cual favorece la supervivencia y persistencia del patógeno. En estudios similares, realizados con distintas cepas de varias especies de *Rhodotorula*, se ha demostrado que la capacidad de producir este tipo de enzimas extracelulares varía mucho⁽⁴⁵⁾. En las pruebas de susceptibilidad a cuatro compuestos antifúngicos, la cepa PCE3 resultó ser resistente al fluconazol, al itraconazol, y al miconazol. En efecto, al realizar el ensayo de Kirby-Bauer, no se observaron halos de inhibición de su crecimiento en presencia de discos conteniendo estos compuestos. Por el contrario, la cepa resultó ser sensible al ketoconazol.

Entre los diversos factores de virulencia expresados por especies del género *Rhodotorula*, destaca la resistencia a los fármacos antifúngicos⁽⁴⁶⁾. Dado que ni el EUCAST ni el CLSI han establecido hasta la fecha puntos de corte específicos para las levaduras ambientales u oportunistas consideradas raras, hemos optado

por presentar aquí sólo resultados descriptivos, basados en el diámetro de los halos de inhibición. Esto significa que hemos categorizado al aislado resistente, sólo cuando la inhibición del crecimiento fue completa. Hemos considerado que, pese a no haber valores de cepas de referencia de la misma especie, las pruebas de difusión en disco presentan beneficios y ventajas, como herramientas para la vigilancia de la resistencia a los antifúngicos. Esto ha sido claramente demostrado con anterioridad, como en el caso del ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study⁽⁴⁾.

Las especies de *Rhodotorula* parecen ser intrínsecamente resistentes al fluconazol, compuesto que se ha descrito como ineficaz para tratar las infecciones causadas por hongos pertenecientes a este género⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. En consonancia con esta información, el aislado identificado como *R. taiwanensis* PCE3 analizado aquí fue insensible al fluconazol, pero también al itraconazol y al miconazol, resultados que se suman a su potencial como patógeno zoonótico. La presencia de cepas pertenecientes al género *Rhodotorula*, en la mucosa nasal de cuyes domésticos criados para consumo humano, merece ser considerada con detenimiento. En efecto, estos roedores son criados en la región andina desde hace siglos con fines ceremoniales o para consumo humano, pues son el ingrediente principal de platos tradicionales. En las zonas montañosas de los países andinos, los cuyes son criados generalmente en la proximidad de los hogares, en instalaciones artesanales. Con mucha frecuencia, los animales se mantienen en el interior de las viviendas, en contacto íntimo con sus propietarios. En diversos trabajos se ha demostrado que los cuyes pueden actuar como reservorios u hospedadores accidentales de distintos patógenos humanos, incluyendo bacterias, protozoarios y virus⁽⁴⁹⁻⁵⁸⁾. Durante su crianza, su faenado, su venta y su preparación, los cuyes son manipulados sin mayores medidas de seguridad y de manera frecuente por criadores, distribuidores, vendedores y consumidores. De forma que la presencia de microorganismos patógenos o potencialmente patógenos en sus tejidos y órganos podría representar un riesgo

desde el punto de vista de la salud pública.

CONCLUSIONES

En resumen, detectamos la presencia de una cepa de *Rhodotorula sp.* en la mucosa nasal de cuyes (*C. porcellus*) criados para consumo humano en la Provincia de Cañar, Ecuador. La cepa, estrechamente relacionada con *R. taiwanensis* y *R. mucilaginosa*, es capaz de producir enzimas extracelulares, como fosfolipasas y hemolisinas. Adicionalmente, es resistente al fluconazol, el itraconazol y al miconazol. Llama la atención que se trate del primer reporte en su tipo, considerando que las zoonosis causadas por este tipo de hongos son conocidas desde hace siglos, y se consideran una amenaza para la salud humana y animal (59). Es por ello que su vigilancia se debe incrementar, con el fin de prevenir infecciones que resulten de la manipulación o el contacto íntimo con dichos animales.

Agradecimientos. Agradecemos a los criadores de cuyes del Cantón Biblián (Cañar), quienes prestaron sus animales y compartieron la información de sus unidades productivas de forma desinteresada para realizar esta investigación. Agradecemos igualmente al Dr. Luis Andrés Yarzabal, por sus valiosos comentarios y sugerencias durante la realización de este trabajo. Este estudio fue financiado con fondos del Proyecto PICCIITT19-37, de la Universidad Católica de Cuenca.

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Tuon F, Costa S. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25(3): 135-40.
2. Butinar L, Santos S, Spencer I, Oren A, Gunde N. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters.* 2005; 244(2): 229-34.
3. Cantrell S, Casillas L, Molina M. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological research.* 2006; 110(8): 962-70.
4. Wirth F, Goldani L. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases.* 2012 Sept: 1-7
5. Chattopadhyay P, Chatterjee S, Sen S. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology.* 2008; 7(17): 2972-85.
6. Arendrup M, Boekhout T, Akova M, Meis J, Cornely O, Lortholary O. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2014;20 (Suppl 3: S76–98).
7. Krzyściak P, Macura A. Drug susceptibility of 64 strains of *Rhodotorula sp.* *Wiadomosci parazytologiczne.* 2010;56(2): 167–70.
8. Dworecka B, Krutkiewicz A, Słzopa D, Kleczkowski M, Biegańska, M. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *The Scientific World Journal.* 2012 Decem: 1-5
9. Wawron W, Bochniarz M, Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2010; 54(2):201–204.
10. Alvarez S, Mateos A, Dominguez L, Martinez E, Blanco J, Garcia M. Isolation of *Rhodotorula mucilaginosa* from skin lesions in a Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Vet Med.* 2010;55(6):297–301.
11. Krzyściak P. Evaluation of selected virulence factors of *Rhodotorula* fungi. [Ph.D. Thesis]. [Cracovia]: Collegium Medicum, Jagielonian University; 2010. 122 p. (tesis)
12. Cafarchia C, Romito D, Coccioli C, Camarda A, Otranto D. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and

- possible implications for human disease. *Med Mycol.* 2008;46(5):429–34.
13. Amaral R, Ibanez J, Mamizuka E, Gambale W, de Paula C, Larsson C. Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hígidos. *Ciência Rural.* 1998; 28(3):4441–45.
 14. Brotto T, Andrade M, Goncalves M, Gimenis F, Pina A. Identification of fungi microflora in the ear conducts of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) kept in captivity. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005; 42(6):459–64.
 15. Shokri H, Khosravi A, Sharifzadeh A, Tootian Z. Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels (*Camelus dromedarius*). *Vet Microbiol.* 2010;144(1–2):183–6.
 16. Pérez E, Fernández L, Pérez E. Fungemia causada por *Rhodotorula* en un lactante crítico. *Rev Cubana Pediat.* 2019; 91(1): e639-647.
 17. Duggal S, Jain H, Tyagi A, Sharma A, Chugh T. *Rhodotorula* fungemia: two cases and a brief review. *Medical Mycology.* 2011; 49(8): 879–82.
 18. Kitazawa T, Ishigaki S, Seo K, Yoshino Y, Ota Y. Catheter-related bloodstream infection due to *Rhodotorula mucilaginosa* with normal serum (1→3)- β -D-glucan level. *J Mycol Med.* 2018; 28(2):393-95.
 19. Deepa A, Nair B, Sivakumar T, Joseph A. Uncommon opportunistic fungal infections of oral cavity: a review. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014;18(2):235–43.
 20. Melville PA, Cogliati B, Mangiaterra MB, Ruz M, Moura SC, Matsuda L, et al. Determination of the microbiota present in cloaca and oropharynx of clinically normal ostriches (*Strutio camellus*). *Cienc Rural.* 2004; 34(6):1871–6.
 21. Medina R, Fuentes R, Arteaga B, Valcárcel R, Arbelo A, Padilla D, et al. Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. *Rev Iberoam Micol.* 2017; 34(4):211–14.
 22. Dornelles G, Araújo G, Rodrigues M, Alves V, Costa R, Abreu J, et al. Harris' hawk (*Parabuteo unicinctus*) as a source of pathogenic human yeasts: a potential risk to human health. *Future Microbiol.* 2022;17 (3): 169-75.
 23. Buela L, Cuenca M, Sarmiento J, Peláez D, Mendoza AY, Cabrera EJ, Yarzabal LA. Role of guinea pigs (*Cavia porcellus*) raised as livestock in Ecuadorian Andes as reservoirs of zoonotic yeasts. *Animals.* 2022; 12(24):3449.
 24. Price M, Wilkinson I, Gentry L. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982; 20(1):7-14.
 25. Luo G, Samaranayake L, Yau J. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(8):2971-4.
 26. Deorukhkar S, Saini S, Mathew S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology.* 2014; 2014: 1-6.
 27. de Llanos R, Fernández MT, Querol A. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006; 90(3):221-31.
 28. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. 2018 CLSI Guideline M44. Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
 29. Almeida G, Bernardi T, Carvalho P, Menegotto M, Valente P. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz Arch Biol Technol.* 2012; 55(2): 319-25.
 30. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990; 18(1): 315-22.
 31. Gardes M, Bruns T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-

- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 1993; 2(2):113-8.
32. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-49.
 33. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-25.
 34. Huang C, Lee F, Tien J, Hsieh PW. *Rhodotorula taiwanensis* sp. nov., a novel yeast species from a plant in Taiwan. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011; 99(2): 297-302.
 35. Zhao X, Aizawa T, Schneider J, Wang C, Shen R, Sunairi M. Complete mitochondrial genome of the aluminum-tolerant fungus *Rhodotorula taiwanensis* RS1 and comparative analysis of Basidiomycota mitochondrial genomes. *Microbiologyopen* 2013; 2(2): 308–17.
 36. Ioannou P, Vamvoukaki R, Samonis G. *Rhodotorula* species infections in humans: A systematic review. *Mycoses.* 2019; 62 (2): 90-100.
 37. Arron S, Dimon M, Li Z, Johnson M, Wood T, Feeney L, et al. High *Rhodotorula* sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(8): 2138-145.
 38. Aruo, S. K. (1980). Necrotizing cutaneous rhodotorulosis in chickens in Uganda. *Avian Diseases.* 1980; 23(4): 1038-43.
 39. Monga D, Garg D. Ovine pulmonary infection caused by *Rhodotorula rubra*. *Mycoses.* 1980; 23(4): 208-11.
 40. Kadota K, Uchida K, Nagatomo T, Goto Y, Shinjo T, Hasegawa T, Tateyama, S. Granulomatous epididymitis related to *Rhodotorula glutinis* infection in a dog. *Veterinary Pathology.* 1995, 32(6): 716-18.
 41. Bourdeau P, Hubert B, Magnol J. Suspicion de dermatomycosea *Rhodotorula mucilaginosa* chez un chat infecté par le FeLV et le FIV. *Recueil de Médecine Veterinaire.* 1992. 168(2):91-96.
 42. Costa EO, Gandra C, Pires M, Coutinho S, Castilho W, Teixeira CM. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia.* 1993; 124(1): 13–17.
 43. Melville P, Cogliati B, Mangiaterra M, Peres M, Moura, S, Matsuda L, et al. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de aves (*Struthio camelus*) clinicamente saudáveis. *Ciência Rural.* 2004;34(6):1871-76.
 44. Pandey N, Gupta M, Tilak R. Extracellular hydrolytic enzyme activities of the different *Candida* spp. isolated from the blood of the Intensive Care Unit-admitted patients. *J Lab Physicians.* 2018; 10(4):392-96.
 45. Seifi Z, Mahmoudabadi A, Hydrinia S, Halvaezadeh M. Extracellular enzymes production and biofilm formation in *Rhodotorula* species. *Current Enzyme Inhibition.* 2016; 12(2): 155-60.
 46. Farmakiotis D, Kontoyiannis D. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 50(3): 318-24.
 47. Pfaller M, Diekema D, Gibbs D, Newell V, Ellis D, Tullio V, et al. Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(1): 1366-77.
 48. Rasmussen T, Kirkeby L, Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *APMIS.* 2000; 108(10): 663–75.
 49. Amman B, Pavlin B, Albarino C, Comer J, Erickson B, Oliver J, et al. Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(5): 719–25.
 50. Lutz-Wohlgröth L, Becker A, Brugnera E,

- Huat Z, Zimmermann D, Grimm F, et al. Chlamydiales in guinea-pigs and their zoonotic potential. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2006; 53(4): 185–93.
51. Fredriksson M, Lindström M, Korkeala H. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions. 2009 Jun: 164-180.
 52. Gruszynski K, Young A, Levine S, Garvin J, Brown S, Turner L, Fritzingler A, et al. *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* infections associated with guinea pigs. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(6): 156–15.
 53. Walther B, Wieler L, Vincze S, Antão E, Brandenburg A, Stamm I, et al. MRSA variant in companion animals. *Emerging infectious diseases*. 2012; 18(12): 2017-20.
 54. González L, Esteban J, Bargues M, Valero M, Ortiz P, Naquira C, et al. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop*. 2011; 120(1-2): 119–29.
 55. Gabastou J, Proano J, Vimos A, Jaramillo G, Hayes E, Gage K, et al. An outbreak of plague including cases with probable pneumonic infection, Ecuador. 1998. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94 (4): 387–91.
 56. Levy M, Bowman N, Kawai V, Waller L, Cornejo J, Cordova E, et al. Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(9): 1345–52.
 57. Zambrano M, Rodríguez S, Rivera I, Salas M, Caceres M, de Waard J, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carriage among guinea pigs raised as livestock in Ecuador. *One Health*. 2020; 9:100118.
 58. Leyva V, Mubareka S, Krammer F, Cárdenas W, Palese P. Influenza virus infection in Guinea pigs raised as livestock, Ecuador. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(7): 1135–37.
 59. Seyedmousavi S, Guillot J, Toloee A, Verweij P, de Hoog G. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21 (5): 416-25.