

MALASSEZIA PACHYDERMATIS: RELAZIONE TRA LA PRODUZIONE DI FOSFOLIPASI E LESIONI CUTANEE

CLAUDIA CAFARCHIA, SABRINA GALLO, DIANA ROMITO, MARIATERESA SASANELLI,
DONATO DE CAPRARIIS, DOMENICO OTRANTO

Dipartimento di sanità e benessere animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bari
Strada provinciale per Casamassima km 3, Valenzano (Bari)

Riassunto

Nel presente studio l'attività fosfolipasica di isolati di *Malassezia pachydermatis* provenienti da cani sani è stata confrontata con quella di isolati da cani con dermatite ed otite. La produzione di fosfolipasi è stata valutata e quantificata, utilizzando il terreno all'uovo, su 254 isolati di *M. pachydermatis* da 33 cani con lesioni cutanee e da 11 cani sani. Gli isolati sono stati raggruppati nel modo seguente: provenienti da un unico sito di lesione dei cani con dermatite localizzata (gruppo A), provenienti da zone senza lesioni degli stessi soggetti (gruppo B), e da diversi siti cutanei dei cani sani (gruppo C).

Almeno un isolato che produceva fosfolipasi è stato evidenziato in tutti i cani del gruppo A. Nel gruppo A è stata registrata un'elevata percentuale (93,9%) di ceppi di *M. pachydermatis*, produttori di fosfolipasi, rispetto agli isolati dei gruppi B (41,4%) e C (10,6%).

Gli isolati di *M. pachydermatis* provenienti dai siti di lesione hanno fatto registrare una attività fosfolipasica significativamente più alta ($P < 0,05$) degli isolati del gruppo B e C. I risultati indicano che la produzione di fosfolipasi degli isolati di *M. pachydermatis* provenienti da tessuti infetti può svolgere un ruolo patogeno in corso di lesioni cutanee.

Summary

This study compares the phospholipase activity of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from healthy dogs versus dogs with dermatitis and otitis. Phospholipase production was evaluated and quantified using the egg-yolk plate method on 254 isolates of *M. pachydermatis* from 33 dogs with skin lesions and 11 healthy dogs. Isolates were grouped on the basis of their site of collection: lesional skin of dogs with dermatitis localised in one site (group A), healthy skin of the same dog with localised lesions (group B) and assorted skin sites of healthy dogs (group C).

At least one phospholipase-producing strain was isolated from all the dogs in group A. A very high percentage of strains of *M. pachydermatis* obtained from group A (93.9%) produced phospholipase, compared to the strains from group B (41.4%) and group C (10.6%). The *M. pachydermatis* strains isolated from lesional skin produced significantly higher phospholipase activity (mean $P < 0.05$) than those coming from group B and C. The results suggest that the production of phospholipases by *Malassezia* in infected tissues may play a pathogenic role in the occurrence of skin lesions.

INTRODUZIONE

Le fosfolipasi sono un gruppo eterogeneo di enzimi che idrolizzano uno o più legami esteri dei glicerofosfolipidi¹. I fosfolipidi e le proteine sono i principali costituenti chimici delle membrane cellulari dell'ospite, e le fosfolipasi e le proteasi sono coinvolte nei processi di distruzione di tali membrane cellulari¹.

Sin dall'inizio degli anni '80 è stato dimostrato che i funghi patogeni opportunisti possono produrre fosfolipasi² danneggiando le membrane della cellula ospite^{3, 4, 5, 6}. L'attività fosfolipasica e la produzione di proteasi sono state evidenziate nei seguenti lieviti: *Candida albicans*^{4, 5, 6, 7, 8, 9}, *Rodhotorula rubra*⁸, *Cryptococcus neoformans*^{10, 11, 12} e *Malassezia furfur*¹³.

I lieviti del genere *Malassezia* sono organismi lipofili che appartengono alla normale microflora cutanea della maggior parte degli animali a sangue caldo, e possono comportarsi da agenti patogeni opportunisti¹⁴. Le specie lipido-dipendenti (e.g. *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*,

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 7/4/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 5/7/2005”.

Malassezia globosa, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta* e *Malassezia slooffiae*) sono associate frequentemente a disordini cutanei nell'uomo, mentre l'unica specie non lipodipendente (i.e. *Malassezia pachydermatis*) è considerata agente patogeno opportunisto responsabile di dermatiti e/o otiti dei cani e dei gatti¹⁴.

Il ruolo patogenetico di tali lieviti è ancora poco conosciuto e pare sia legato ad alterazioni dei normali meccanismi fisici, chimici o immunologici di difesa della cute e a reazioni di ipersensibilità da parte dell'ospite dopo esposizione agli antigeni da *Malassezia*¹⁵.

La proliferazione dei lieviti del genere *Malassezia* rappresenta comunque una delle condizioni primarie e necessarie allo sviluppo di dermatite e/o otite^{16, 17}.

L'attività fosfolipasica di *Malassezia* spp. e la produzione della proteasi, sono state studiate per *M. furfur* isolata dall'uomo¹³, e per altre specie di *Malassezia* isolate dai cani e dai gatti con lesioni cutanee^{18, 19}.

Lo scopo del presente lavoro è valutare e confrontare l'attività fosfolipasica di isolati di *M. pachydermatis* provenienti da cani sani e da cani con dermatite e/o otite per verificare l'eventuale coinvolgimento nell'insorgenza delle lesioni.

MATERIALI E METODI

Prelievo del campione

Da marzo 2002 a luglio 2003, sono stati esaminati 87 cani di cui 54 con lesioni cutanee localizzate e 33 sani.

I cani con lesioni (54) erano affetti da dermatite eritematosa pruriginosa localizzata in un singolo sito anatomico; 15 avevano dermatite perilabiale, 9 dermatite interdigitale, 6 dermatite inguinale e 24 soggetti erano affetti da otite esterna bilaterale ceruminosa. I soggetti avevano età compresa tra cinque mesi e 10 anni, 26 erano femmine e 28 maschi.

I cani sani (33) erano in buone condizioni di salute e non avevano presentato dermatiti e otiti nei 5 mesi precedenti al prelievo e, non erano stati sottoposti ad alcun trattamento nello stesso periodo. I soggetti avevano età compresa tra sei mesi e 10 anni, 14 erano femmine e 19 maschi.

I cani appartenevano a diverse razze ed incroci e provenivano dalla provincia di Bari.

Per ciascun animale il prelievo del campione è stato effettuato mediante tampone sterile umidificato in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) da sette siti anatomici (i.e. zona periorbitale, perilabiale, dorso, zona perianale, inguinale, interdigitale e condotto uditivo esterno dell'orecchio destro). Il tampone è stato strofinato su un'area di cute pari a 25 cm² di superficie. Il prelievo del campione dagli spazi interdigitali, dalla zona periorbitale e dalla zona perilabiale è stato eseguito per strofinamento dell'intera zona.

Isolati fungini

I tamponi, recapitati in laboratorio entro 3 ore dal prelievo, sono stati seminati in piastre di Dixon Agar^{20, 21, 22} e le piastre sono state incubate alla temperatura di 32°C per 7 giorni.

Per ciascun campione positivo sono state isolate 4 colonie per sottoporle alla successiva identificazione. L'identificazione è stata effettuata come proposto da Guillot²³ mediante lo studio dei caratteri morfologici, assimilazione di Tween 20, 40, 60, 80 (Tween®: Sigma- Aldrich- Milano). Test aggiuntivi quali: scissione dell'esculina, assimilazione del triptofano e del PeG 35 castor oil (Cremophor® EL: Sigma- Aldrich- Milano) sono stati utilizzati per la caratterizzazione di *M. furfur*^{24, 25}.

Duecentocinquantaquattro isolati di *Malassezia pachydermatis* provenienti da 44 cani, sono stati sottoposti allo studio dell'attività fosfolipasica e divisi in tre gruppi:

- gruppo A = 66 isolati (2 per ogni sito) dai siti di lesione di 33 cani con dermatite localizzata in un solo sito;
- gruppo B = 122 isolati (2 per ogni sito) da uno o da due siti sani della cute di cani del gruppo A;
- gruppo C = 66 isolati (2 per ogni sito) da differenti siti cutanei di 11 cani sani.

Valutazione della produzione di fosfolipasi

La produzione di fosfolipasi è stata determinata secondo il metodo di Price, utilizzando il terreno al rosso d'uovo⁵. Le piastre di terreno all'uovo sono state inoculate con 10 µl di una sospensione di lievito dalla carica di 10⁸ Unità Formanti Colonia (UFC)⁶ e successivamente incubate a 32°C. La lettura è stata effettuata giornalmente dal settimo al dodicesimo giorno di incubazione.

La formazione di aloni di precipitazione intorno alla colonia è stata considerata indicativa della produzione di enzimi. La produzione delle fosfolipasi (Pz) è stata espressa come rapporto tra diametro delle colonie (a) e diametro totale delle colonie con la zona di precipitazione (b)⁵. L'attività fosfolipasica è stata classificata come molto alta (Pz<0,64), alta (0,64<Pz>1) o nulla (Pz=1)¹⁷. Ogni ceppo è stato testato in doppio ed il Pz considerato è rappresentato dalla media dei due valori di Pz misurati.

Analisi statistica

Il T- student test è stato usato per confrontare il valore di Pz dei ceppi isolati dai cani con e senza lesioni. Il chi-quadro (χ^2) è stato usato per confrontare la frequenza di cani che presentavano almeno un isolato produttore di fosfolipasi nei diversi gruppi. Un valore di p<0,05 è stato considerato significativo.

RISULTATI

Dei 646 isolati ottenuti dagli 87 cani esaminati, 618 (95,7%) sono stati identificati come *M. pachydermatis* e 28 (4,3%) come *M. furfur*.

In particolare, 461 (74,6%) isolati di *M. pachydermatis* sono stati raccolti dagli animali con lesioni, 157 (25,4%) da diversi siti dei cani sani, e i 28 isolati di *M. furfur* sono stati raccolti da diversi siti cutanei dei cani sani.

In tutti gli isolati di *M. pachydermatis* l'attività fosfolipasica è stata evidenziata dopo dieci giorni di incubazione,

solo in tre isolati tale attività è stata rilevata dopo sette giorni di incubazione.

La Tabella 1 riporta il numero e la percentuale dei cani appartenenti ai gruppi A, B e C che presentano almeno un isolato di *M. pachydermatis* con attività fosfolipasica (espressa come il valore medio di Pz). Il T-student test ha permesso di evidenziare differenze significative fra i valori di Pz degli isolati provenienti dai tre gruppi (i.e. A B e C) (Tab. 1). L'analisi statistica (χ^2) ha permesso di evidenziare differenze significative fra le percentuali dei cani che presentavano almeno un isolato con attività fosfolipasica fra i gruppi esaminati (Tab. 1). La Tabella 2 mostra i risultati dell'attività fosfolipasica di isolati di *M. pachydermatis* classificati secondo il valore di Pz.

CONCLUSIONI

Uno dei principali quesiti nello studio delle dermatiti e/o otiti da *Malassezia* spp. è come tali organismi commensali possano divenire organismi patogeni opportunisti.

L'esistenza di una correlazione fra produzione di fosfolipasi e patogenicità dei lieviti è stata precedentemente studiata per *C. albicans*^{3, 4, 5, 6} e per *C. neoformans*^{10, 11, 12}.

In particolare, è stato dimostrato che isolati di *C. albicans* con alto potenziale patogeno (i.e. elevato grado di adesione alle cellule epiteliali orali) presentano una più alta attività fosfolipasica dei lieviti che costituiscono la normale microflora³. Inoltre, isolati di *C. albicans* provenienti da pazienti con infezioni ematiche (candidemie) hanno una maggiore attività fosfolipasica rispetto a quella eviden-

ziata in isolati provenienti da ferite o da infezioni urinarie (candidosi)^{4, 5}. Similmente, è stato dimostrato che isolati di *C. neoformans* provenienti da infezioni in pazienti con AIDS mostrano più alta attività fosfolipasica rispetto agli isolati provenienti dai pazienti non affetti da AIDS^{11, 12}.

Per quanto riguarda *M. pachydermatis*, in un solo studio è stata evidenziata la produzione di fosfolipasi da parte degli isolati da cani con lesioni¹⁸. Nel presente studio, tutti gli isolati da cani con lesioni (gruppo A) hanno evidenziato attività fosfolipasica, diversamente dagli isolati provenienti da cani dei gruppi B e C. Per contro, soltanto cinque cani sani (gruppo C) hanno presentato uno o più isolati produttori di fosfolipasi. In particolare, una percentuale molto alta di isolati di *M. pachydermatis* del gruppo A (93,9%) ha prodotto fosfolipasi, rispetto a quelli del gruppo B (41,8%) e del gruppo C (10,6%).

Inoltre, gli isolati di *M. pachydermatis* raccolti dai siti cutanei di lesione hanno presentato una attività fosfolipasica significativamente più elevata ($Pz < 0,05$) di quella prodotta da isolati del gruppo B e C. Tali osservazioni suggeriscono che l'attività fosfolipasica può svolgere un ruolo importante nell'insorgenza delle lesioni cutanee nei cani.

La presenza sulle lesioni cutanee di quattro (6,0%) isolati di *M. pachydermatis* che non producevano fosfolipasi insieme a quelle che le producevano, può essere dovuta al fatto che le lesioni erano in una fase precoce dell'infezione e nel sito di lesione potevano essere contemporaneamente presenti isolati di *M. pachydermatis* patogena e non patogena come anche alla produzione da parte di tali isolati di altri enzimi quali proteasi e/o perossidasi responsabili della infiammazione¹⁵.

Tabella 1

Numero e percentuale di cani appartenenti ai gruppi A, B e C che presentano almeno un isolato con attività fosfolipasica. L'attività fosfolipasica è espressa come il valore medio di Pz. Le differenze statistiche sono indicate con la stessa lettera

Isolati	Cani		Isolati di <i>M. pachydermatis</i>			
	Positivi/tot	%	Positivi/tot	%	Valori di Pz	Valore medio di Pz (ds)
Gruppo A	33/33	100 a	62/66	93,9 b	0,46-1	0,72 (0,13)c
Gruppo B	28/33	84,8 a	51/122	41,8 b	0,48-1	0,89 (0,15)c
Gruppo C	5/11	45,5 a	7/66	10,6 b	0,46-1	0,97 (0,10)c
TOTALE	-	-	120	47,2	-	

Tabella 2

Attività fosfolipasica di isolati di *Malassezia pachydermatis*, classificata in base al valore di Pz

Isolati	Molto alto Pz<0,64		Alto 0,64<Pz<1		Nullo Pz=1	
	N/tot	%	N/tot	%	N/tot	%
Gruppo A	18/66	27,3	44/66	66,6	4/66	6,0
Gruppo B	15/122	12,3	36/122	29,5	71/122	58,2
Gruppo C	2/66	3,0	5/66	7,5	59/66	89,4
TOTALE	34/254	13,4	85/254	33,5	134/254	52,8

Per contro, l'individuazione di sette isolati (10,5%) di *M. pachydermatis* che producevano fosfolipasi da cinque (45,5%) cani sani (gruppo C) può essere spiegato dal fatto che le lesioni non erano ancora comparse al momento del prelievo del campione.

Per concludere, l'individuazione dell'attività fosfolipasi- ca nel 41,4% degli isolati da 28 (84,8%) cani del gruppo B conferma il presupposto che i cani che presentano un solo sito di lesione albergano popolazioni di *M. pachydermatis* produttrici e non di fosfolipasi in siti senza lesioni cutanee rilevabili. Ciò può essere dovuto ad una contaminazione a partire dalla cute con lesione o ad una mutevole patogenicità della popolazione dei lieviti commensali.

La misurazione della Pz tramite coltura in terreno al rosso d'uovo⁵ si è rivelata una metodica semplice. È importante segnalare che per rilevare l'attività fosfolipasi- ca di *M. pachydermatis* sono stati necessari dieci giorni di incubazione a 32°C, a differenza dei due e dei sei giorni necessari per *C. albicans* e *C. neoformans*, rispettivamente^{6, 11}. Questi risultati confermano quelli di altri autori¹⁸ ed indicano che i lieviti del genere *Malassezia* producono fosfoli- pasi più lentamente di *C. albicans* e *C. neoformans*. Questo studio suggerisce che l'attività fosfolipasi- ca rappresenta uno dei fattori di virulenza del lievito e può avere un ruolo nell'insorgenza delle lesioni cutanee. Tuttavia, le fosfoli- asi dovrebbero essere considerate come uno dei tanti fatto- ri, coinvolti nella complessa interazione fra lievito e ospite, che conducono allo sviluppo delle lesioni cutanee.

Parole chiave

Malassezia pachydermatis; fosfolipasi; virulenza.

Keys words

*Malassezia pachydermatis; Phospholipase production; vi-
rulence of Malassezia yeasts.*

Bibliografia

1. Pranab KM, Mahmoud AG: Secretory protein in fungal virulence. In: Fungal pathogenesis: Principle and Clinical Applications. Ed by Richard A. Calderone and L. Cihlar Ronald, Washington D.C, Marcel Dekker. 2002, pp 51-80.
2. Hanel H, Menzel I, Holzmann H: High phospholipase A-activity of *Candida albicans* isolated from intestine psoriatic patients. *Mycoses* 31: 451-453, 1988.

3. Barret-Bee K, Hayes KY, Wilson RG, Ryley JF: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 131: 1217-1222, 1985.
4. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 63: 1993-1998, 1995.
5. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO: Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7-14, 1982.
6. Samaranyake LP, Reaside JM, Mac Farlane TW: Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 22: 201-207, 1984.
7. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, et al: Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 130-180, 1998.
8. Mayser P, Laabs S, Heuer KV, Grunder K: Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathologia* 135: 149-155, 1996.
9. Polak A: Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses* 35: 9-16, 1992.
10. Chen SC, Muller M, Zhou JZ, et al: Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *Infect Dis* 175 (2): 414-20, 1997.
11. Vidotto V, Sinicco A, Di Fraia D, et al: Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 136: 119-123, 1996.
12. Vidotto V, Leone R, Sinicco A, et al: Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 142: 71-76, 1998.
13. Riciputo RM, Oliveri S, Micali G, Sapuppo A: Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses* 39: 233-235, 1996.
14. Guillot J, Bond R: *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 4: 72-73, 1999.
15. Chen T. and Hill PB: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol* 16 (1): 4-26, 2005.
16. Bond R, Lloyd D: Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in Healthy and seborrheic Basset hound. *Vet Dermatol* 8: 101-106, 1997.
17. Cafarchia C, Gallo S, Romito D, et al: Frequency, body distribution and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest* 17 (4): pp 316-322, 2005.
18. Coutinho SD, Paula CR: Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol* 38: 73-76, 2000.
19. Mancianti F, Rum A, Tardoni S, Corazza M: Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 149: 131-135, 2000.
20. Bond R, Collin NS, Lloyd DH: Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *J Small Anim Pract* 35: 68-72, 1994.
21. Midgley G, Guého E, Guillot J: Disease caused by *Malassezia* species. In: Microbiology and microbial infection. L. Ajello and R.J. Hay (ed.). United Kingdom Arnold, London, Topley & Wilson's, vol 4. 1998, pp 201-211.
22. Van Abbe NJ: The investigation of dandruff. *J Soc Cosmet Chem* 15: 609-630, 1964.
23. Guillot J, Guého E, Lesourd M, et al: Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 6: 103-110, 1996.
24. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, et al: Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of *Cremophor* EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 137: 208-213, 1997.
25. Mayser P, Wille G, Imkamp A, et al: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41: 265-271, 1998.