

FREQUENZA E DISTRIBUZIONE QUANTITATIVA DEI LIEVITI DEL GENERE *MALASSEZIA* IN CANI SANI E IN CANI CON DERMATITE O OTITE

CLAUDIA CAFARCHIA¹, SABRINA GALLO¹, GIOIA CAPELLI², DOMENICO OTRANTO¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari,
Str. prov.le per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano, Bari (Italy)

²Dipartimento di Scienze Veterinarie Sperimentali, Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova (Italy)

Riassunto

Lo scopo del presente lavoro è quello di determinare la frequenza di isolamento e la quantità di carica delle differenti specie di *Malassezia* nei diversi siti anatomici di cani sani e con lesioni cutanee localizzate e confrontare l'attendibilità dell'esame citologico e dell'esame colturale nella diagnosi delle infezioni da *Malassezia* spp. Da marzo 2002 a luglio 2003 sono stati esaminati 33 cani sani e 54 con lesioni cutanee localizzate. Il campione è stato prelevato mediante tampone sterile da sette siti cutanei, e sottoposto all'esame citologico e colturale. Nei cani sani la zona perianale (60,6%) e la rima perilabiale (36,4%) risultano le zone più frequentemente colonizzate. Nei cani con dermatopatie localizzate, è stato registrato un aumento di frequenza e di quantità di carica nei siti di lesione rispetto a quelle registrate negli animali sani e questo ha permesso di ipotizzare un ruolo patogeno di *Malassezia* spp. nella comparsa delle lesioni cutanee. *M. pachydermatis* è stata la specie più frequentemente isolata sia nei cani sani che nei cani con lesioni (95,7%) e *M. furfur* (4,3%) è stata isolata esclusivamente da cani sani. L'esame citologico ha mostrato una buona specificità (96,2%) ed una bassa sensibilità (30%) al confronto con l'esame colturale.

Summary

The aim of this work is to determine the frequency of isolation and population size of *Malassezia* yeasts from different sites of healthy dogs and dogs with pruritic localized skin lesions. The efficiency of cytological examination and fungal culture for *Malassezia* detection was also evaluated. From March 2002 to July 2003, 33 owned healthy dogs and 54 owned dogs with pruritic erythematous localized dermatitis were examined. For all the animals sterile cotton swabs were collected from seven anatomical sites for cytological and cultural examination. Yeasts belonging to the *Malassezia* genus were recovered from different cutaneous sites of healthy dogs and the perianal and perioral areas were the sites with the highest frequency of isolation. Among dogs with localized dermatitis the frequency of isolation of *Malassezia* yeasts and the population size from sites with lesions were higher than those from the same sites of healthy dogs. *M. pachydermatis* was the yeast most commonly retrieved in healthy and not healthy dogs (95.7%), and *M. furfur* was only isolated from healthy dogs (4.3%). Statistical comparison between fungal culture and cytological examination showed good specificity (96.2%) but very low sensitivity (30%) for the latter.

INTRODUZIONE

I lieviti del genere *Malassezia* sono organismi unicellulari che non formano micelio e si riproducono per gemmazione monopolare¹⁻². Le specie appartenenti al genere *Malassezia* sono state recentemente classificate in base a caratteri morfologici, biochimici e molecolari²⁻³.

Il genere comprende 9 specie lipidodipendenti (i.e. *Malassezia dermatis*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia sloffiae*, e *Malassezia sympodialis*) ed una sola specie non lipidodipendente (i.e. *Malassezia pachydermatis*)²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶.

Sono componenti della flora microbica della cute dell'uomo e degli animali a sangue caldo e possono comportarsi da agenti patogeni opportunisti. 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 cute⁷. In un recente studio è stata

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 25/10/2004 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 24/1/2005”.

inoltre dimostrata una correlazione diretta tra l'attività fosfolipasica di alcuni ceppi di *M. pachydermatis* e la loro patogenicità a livello cutaneo⁸.

In generale, le specie lipidodipendenti sono frequentemente associate a disordini cutanei dell'uomo, mentre *M. pachydermatis* è considerata agente patogeno opportunista responsabile di lesioni cutanee croniche e di otite esterna nei cani e nei gatti⁷⁻⁹. Recentemente alcune specie lipidodipendenti (*M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis*) sono state isolate sia da cani che da gatti con e senza lesione¹⁰⁻¹¹⁻¹²⁻¹³⁻¹⁴ mentre *M. pachydermatis* è stata isolata da casi di setticemia in bambini nati prematuri e in soggetti immunodepressi¹⁵⁻¹⁶. L'isolamento da cani di specie diverse da *M. pachydermatis* ha suscitato un particolare interesse poiché alcuni autori sostengono che *M. furfur* non possa essere isolata da carnivori domestici¹⁷.

Infine studi effettuati sull'ecologia di *M. pachydermatis* hanno dimostrato un'elevata frequenza di isolamento del lievito da cani sani e una diversa distribuzione quantitativa in differenti siti cutanei⁷⁻¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰.

Dalla bibliografia a nostra disposizione, non sono stati effettuati studi sulla frequenza e sulla quantità di lieviti del genere *Malassezia* in cani con lesioni cutanee pruriginose localizzate in un solo sito corporeo.

L'obiettivo del presente lavoro è determinare la frequenza di isolamento e la quantità delle differenti specie di *Malassezia* nei siti anatomici di cani sani e con lesioni localizzate e confrontare l'esame citologico e l'esame colturale per la diagnosi delle infezioni da *Malassezia* spp.

MATERIALI E METODI

Prelievo del campione

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

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

I 54 cani con lesioni erano affetti da dermatite eritematosa pruriginosa localizzata in un solo sito anatomico, in particolare, 15 presentavano dermatite perilabiale, nove dermatite interdigitale, sei dermatite inguinale e 24 soggetti erano affetti da otite esterna bilaterale. I soggetti appartenevano a diverse razze ed incroci, ed avevano età compresa tra cinque mesi e 10 anni, 26 erano femmine e 28 maschi. Tutti gli animali provenivano dalla provincia di Bari.

Per ciascun animale il prelievo dei campioni è stato effettuato mediante tampone sterile umidificato in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%)²¹ 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 due aree adiacenti di cute pari a 25 cm² di superficie. Il prelievo del campione dagli spazi interdigitali, dalla zona periorbitale, dalla zona perilabiale è stato eseguito per strofinamento dell'intera zona.

Esame colturale

I tamponi, recapitati in laboratorio entro 2 ore dal prelievo, sono stati seminati in piastre di Dixon Agar e le piastre sono state incubate alla temperatura di 32°C per una settimana¹⁸⁻²²⁻²³.

I campioni che risultavano negativi per *Malassezia* spp. oltre il settimo giorno sono stati scartati. Dai campioni positivi è stata effettuata una conta delle colonie cresciute (esprese come unità formanti colonia: UFC) fino ad un massimo di 280 colonie. Quattro colonie per ciascun campione positivo sono state isolate in slants di Dixon agar incubate a 32°C per sette giorni per sottoporle alla successiva identificazione. L'identificazione è stata effettuata mediante lo studio dei caratteri morfologici, assimilazione di Tween 20, 40, 60, 80 (Tween®: Sigma- Aldrich S.r.l, Milano)²⁴.

Test aggiuntivi quali: scissione dell'esculina, assimilazione del triptofano e del PeG 35 castor oil (Cremophor® EL: Sigma) sono stati utilizzati per la caratterizzazione di *M. furfur*²⁵⁻²⁶.

Esame citologico

Di ciascun campione è stato effettuato un esame citologico, colorato con May-Grunwald Giemsa, per valutare il numero di cellule di *Malassezia* spp. presenti. I risultati di tale esame sono stati riportati come: esame negativo, quando il campione presentava un numero di cellule compreso tra 0 e <10, per i campioni prelevati dall'orecchio, e tra 0 e <5 per i campioni prelevati dai distretti anatomici, per campo ad ingrandimento a 40X. L'esame è stato considerato positivo quando il campione presentava un numero di cellule per campo ed ingrandimento 40X, >10 per il condotto uditivo esterno e >5 se il prelievo veniva effettuato da altri distretti cutanei²⁷⁻²⁸.

Analisi statistica

I cani sono stati considerati positivi alla ricerca di *Malassezia* spp. solo quando era positivo l'esame colturale.

La prevalenza di *Malassezia* spp. nei cani sani e nei cani con lesioni in relazione ai siti testati, è stata analizzata mediante il Chi-square test e/o il Fisher exact test. La concordanza tra i risultati ottenuti dall'esame citologico e dall'esame colturale è stata calcolata tramite il k statistico.

La sensibilità e la specificità dell'esame citologico sono state calcolate usando come gold standard i risultati dell'esame colturale.

Le differenze nella distribuzione quantitativa (unità formanti colonia: UFC) dei lieviti nei cani sani e con lesioni, sono state analizzate mediante l'analisi della varianza (ANOVA), utilizzando il Bonferroni test per post-hoc a due vie. L'analisi della varianza è stata anche utilizzata per mettere a confronto la densità di carica nei cani sani e con lesioni che presentavano un esame citologico negativo. Settanta unità formanti colonia è stato utilizzato come valore soglia per discriminare i siti infetti dei cani sani da quelli dei cani con lesioni.

Il software utilizzato è stato SPP (versione 11.5, 2001) e WinEScope 2.0 (accessibile on line a <http://www.clive.ed.ac.uk/winescope/>).

RISULTATI

I lieviti del genere *Malassezia* sono stati isolati in almeno un sito anatomico da 45 cani (51,7%), con una più alta prevalenza (61,1%) nei cani con lesioni che in quelli sani (36,4%) ($p < 0,05$). Ventinove cani (33,3%) erano positivi in un solo sito, cinque (5,7%) erano positivi in due siti, nove (10,3%) in tre siti e due (2,3%) in quattro siti. Dei 646 lieviti isolati, 618 (95,7%) sono stati identificati come *M. pachydermatis* e 28 (4,3%) come *M. furfur*. Quattrocentosessantuno (74,6%) *M. pachydermatis* sono state isolate da animali sintomatici e 157 (25,4%) da diversi siti di cani sani, mentre *M. furfur* è stata isolata esclusivamente da siti di animali dermatologicamente sani.

La prevalenza di *Malassezia* spp. per ciascun sito anatomico analizzato nei cani con e senza lesioni è riportata in Tabella 1.

Nei cani sani i lieviti del genere *Malassezia* sono stati isolati in uno o più siti anatomici. La zona perianale (60,6%) è risultata più frequentemente colonizzata mentre la zona inguinale (3%) è quella meno frequentemente positiva.

La prevalenza di *Malassezia* spp. è generalmente più elevata nei cani con lesioni rispetto a quella registrata nei cani sani ed è significativamente più elevata a livello inguinale, interdigitale e del condotto uditivo esterno (Tab. 1).

Nei cani con lesioni la più alta percentuale di isolamento si è avuta nel sito di lesione. *Malassezia* spp. è stata isolata da tutti i soggetti con lesioni a livello inguinale e a livello degli spazi interdigitali e con una frequenza minore da animali con lesioni a livello di altri siti (Tab. 1). Inoltre una elevata frequenza di isolamento di *Malassezia* spp. è stata registrata, nei cani con lesioni, in siti che non presentavano alterazioni.

La distribuzione quantitativa dei lieviti del genere *Malassezia* nei diversi siti corporei di animali con e senza lesioni è riportata in Tabella 2. Una più alta densità di carica è stata registrata dai siti con lesione rispetto ai siti sani. Le differenze riscontrate non sono, tuttavia, statisticamente significative ($p > 0,05$). Il più alto numero di *Malassezia* spp. è stato registrato nella zona perilabiale (182,22 UFC/tampone) e nel condotto uditivo esterno (185 UFC/tampone).

Tabella 1
Numero e percentuale di cani positivi all'esame culturale in diversi siti anatomici in relazione ai siti di lesione e nei cani sani
Le differenze significative sono indicate con le stesse lettere ($p < 0,05$)

Cani positivi (%) nei siti testati								
Lesione	Cani testati	Zona periorbitale	Rima labiale	Zona perianale	Inguine	Spazi interdigitali	Dorso	Condotto uditivo esterno
Inguinale	6	6 (100) ^a	6 (100)	3 (50)	6 (100) ^{def}	3 (50)	0	6 (100) ^h
Interdigitale	9	6 (66,7) ^b	9 (100)	3 (33,3)	0 ^d	9 (100) ^g	3 (33,3)	0
Otite	24	6 (25)	6 (25)	3 (12,5) ^c	3 (12,5) ^e	3 (12,5)	3 (12,5)	12 (57,1) ⁱ
Perilabiale	15	6 (40)	9 (60)	6 (40)	3 (20)	6 (40)	3 (20)	3 (20)
Nessuna (cani sani)	33	3 (9,1) ^{ab}	12 (36,4)	20 (60,6) ^c	1 (3) ^f	6 (18,2) ^g	3 (9,1)	4 (12,1) ^{hi}
Totale	87	27 (31,0)	42 (48,3)	35 (40,2)	13 (14,9)	27 (31,0)	12 (13,8)	25 (29,8)

Tabella 2
Distribuzione quantitativa di lieviti del genere *Malassezia*
(espresse in unità formanti colonia: UFC) isolati da diversi siti anatomici di cani con lesioni localizzate e cani sani

Media delle UFC nei siti testati (ds)								
Lesione	Cani esaminati	Zona periorbitale + UFC	Rima labiale + UFC	Zona perianale + UFC	Inguine + UFC	Spazi interdigitali + UFC	Dorso + UFC	Condotto uditivo esterno + Ufc
Inguinale	6	6 3,17 (2,14)	6 138,50 (141,26)	3 1,33 (0,58)	6 107,50 (102,16)	6 3,00 (1,00)	0	5 88,0 (113,39)
Interdigitale	9	6 79,17 (85,4)	9 91,67 (82,76)	3 2,0 (1,00)	0	3 107,78 (114,63)	3 5,0 (1,0)	0
Otite	24	6 12,50 (6,16)	6 14,17* (13,79)	3 1,0 (0,0)	3 31,0 (1,0)	9 42,00 (2,00)	3 2,0 (1,0)	12 185,0 (30,9)
Perilabiale	15	6 7,83 (4,1)	9 182,22* (37,01)	6 1,50 (0,84)	3 24,0 (5,29)	3 104,17 (102,78)	3 3,0 (1,0)	3 106,67 (30,55)
Nessuna (cani sani)	33	3 83,0 (103,18)	12 122,42 (91,72)	20 73,50 (72,57)	1 70,0	6 54,67 (74,37)	3 34,67 (56,6)	4 110,50 (104,17)

* ANOVA $p < 0,05$.

Tabella 3
Concordanza dei risultati ottenuti dall'esame colturale e citologico dei cani sani e con lesioni localizzate.
La sensibilità (Se) e la specificità (Sp) dell'esame citologico sono confrontate con i risultati dell'esame colturale

TEST		Esame colturale			Concordanza	
Esame citologico		Neg	Pos	Tot	k (p value)	Se-Sp (95% CI)
Cani sani	Neg	182	34	216	0,41 (0,000)	30,6% (17,7-43,5) 100
	Pos	0	15	15		
	Tot	182	49	231		
Cani con lesioni	Neg	227	92	319	0,30 (0,000)	29,7% (21,9-37,6) 93,4% (90,3-96,5)
	Pos	9	39	48		
	Tot	236	131	367		
Cani esaminati	Neg	409	126	535	0,34 (0,000)	30 (23,3-36,7) 96,2 (94,4-98)
	Pos	9	54	63		
	Tot	418	180	598		

Confronto tra esame citologico ed esame colturale

La attendibilità dell'esame citologico confrontato con l'esame colturale, calcolato su 598 campioni in termini di concordanza sensibilità e specificità, è riportato in Tabella 3.

L'esame citologico mostra una moderata concordanza con i risultati dell'esame colturale prendendo in considerazione tutti i cani con e senza lesioni. L'esame citologico mostra una buona specificità (i.e. basso numero di falsi positivi) associato ad una bassa sensibilità (30% cioè alto numero di falsi negativi). La densità di carica espressa come UFC medio di *Malassezia* spp. in cani sani e in cani con lesioni, che presentavano un esame citologico negativo è riportata in Tabella 4.

Il limite di 70 UFC, utilizzato come valore discriminante per la diagnosi colturale di dermatite e otite da *Malassezia* spp., ci permette di classificare come negativi 210 siti su 234 (90,7%) nei cani sani e, come positivi, 27 siti su 51 (52,9%) nei cani con lesioni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine evidenziano che i lieviti del genere *Malassezia* fanno parte della normale microflora cutanea e si presentano non uniformemente distribuiti sulla cute di soggetti dermatologicamente sani. Le zone più frequentemente colonizzate sono rappresentate dall'ano e dalle labbra (60,6% e 36,4% rispettivamente). La zona perilabiale e il condotto uditivo esterno sono i siti anatomici da cui è possibile isolare il maggior numero di lieviti, mentre le zone meno frequentemente positive sono rappresentate dall'inguine, dalla zona perioculare, dal dorso e dagli spazi interdigitali, che sono anche le zone con la più bassa carica di lieviti.

L'alta frequenza di isolamento dal perineo è in accordo con i risultati di precedenti lavori¹⁸⁻²⁹⁻³⁰ e suggerisce che tale zona possa essere "carriage" di *Malassezia* spp. Anche il basso numero di lieviti registrato nella zona inguinale è in accordo con studi precedenti effettuati su cani sani³⁰.

Tabella 4
Distribuzione quantitativa di lieviti del genere *Malassezia*
(esprese in unità formanti colonia: UFC) isolati da diversi siti
anatomici di cani con lesioni localizzate e cani sani
che hanno presentato esame citologico negativo

Cani	N° campioni	UFC Media
Sani	34	69,94*
Con lesioni	18	119,72*
Totale	52	87,17

*ANOVA p<0,05.

Al contrario, la minore quantità di lieviti da noi riscontrata a livello degli spazi interdigitali non concorda con i risultati di indagini precedenti¹⁸ probabilmente a causa della differente tecnica di prelievo da noi impiegata. Infatti nell'esame della microflora cutanea i risultati possono essere influenzati dalla tecnica di prelievo³¹ del campione. Per l'esame citologico le tecniche di prelievo sono: impronta su vetrino, uso di tamponi sterili, raschiato cutaneo e scotch test¹⁹⁻²⁰⁻²¹, mentre per l'esame colturale, il campione può essere prelevato sia con tampone sterile sia mediante l'uso di "piastre da contatto"¹⁸.

Sebbene alcune delle suddette tecniche possano risultare meno sensibili di altre, nessuna è stata comunemente accettata come standard¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰⁻²¹⁻³⁰. Nel presente lavoro, per il prelievo dei campioni, si è ritenuto opportuno l'impiego di tamponi sterili inumiditi in soluzione fisiologica, a causa della semplicità di esecuzione e perché tale tecnica può essere impiegata sia per l'esame citologico che per l'esame colturale.

Per quanto riguarda i cani con dermatopatie localizzate, i soggetti con lesioni inguinali e degli spazi interdigitali sono risultati tutti positivi all'esame colturale per la ricerca dei lieviti del genere *Malassezia*, mentre i soggetti con lesioni a livello della rima labiale e del condotto uditivo esterno sono risultati meno frequentemente positivi. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il condotto uditivo esterno e la rima labiale rappresentano dei siti in

cui altri agenti eziologici possono localizzarsi e determinare la patologia.

Per ciò che concerne la distribuzione quantitativa dei lieviti nei siti di lesione (rima labiale, inguine, spazi interdigitali, condotto uditivo esterno) dei cani malati, i risultati del presente lavoro, evidenziano una elevata quantità di lieviti nei siti di infezione e, contemporaneamente in altre zone del corpo dermatologicamente sane.

La maggiore frequenza di isolamento di lieviti nei siti di infezione dei cani con lesione è significativamente più elevata della frequenza di isolamento rilevata negli stessi siti dei soggetti sani. Tale risultato non concorda con quello ottenuto in studi precedenti in cui la frequenza di isolamento era uguale nei cani con e senza lesioni³²⁻³³.

Inoltre l'elevata densità di carica registrata nei siti di lesione ci permette di affermare che i lieviti del genere *Malassezia* proliferano nel sito di infezione. L'aumento di carica nelle zone sane dei cani con lesioni potrebbe essere solo transitorio e dovuto a fenomeni condizionati dal comportamento indotto nell'animale dal prurito. Infatti si è notato che in animali con lesioni a livello della zona inguinale, la carica del lievito è elevata anche a livello della rima labiale (l'animale si lecca); in animali con lesioni a livello perilabiale, la carica è elevata a livello interdigitale (l'animale si gratta).

I fattori che permettono la trasformazione di *Malassezia* spp. da organismo commensale ad agente patogeno sono poco conosciuti e presumibilmente sono legati a fattori immunologici, chimici e fisici che determinano un'alterazione del microclima cutaneo^{7-8,34}. La proliferazione del lievito è comunque una condizione necessaria a determinare patologia; in quanto l'otite da *Malassezia* spp in cani sani è stata indotta sperimentalmente mediante un'elevata dose infettante di cellule di *M. pachydermatis*³⁵⁻³⁶.

Per quanto riguarda le specie isolate i risultati del presente lavoro confermano che il canale auricolare del cane e la cute sono frequentemente colonizzati da *M. pachydermatis* e, raramente, da altre specie di *Malassezia* lipidodipendenti come *M. furfur*.

Generalmente *M. furfur* è isolata dalla cute sana e malata dell'uomo, *M. pachydermatis* è ritenuta invece, la specie isolata con maggiore frequenza dalla cute e/o dal condotto uditivo esterno degli animali. La presenza di specie lipidodipendenti nei carnivori domestici è stata segnalata solo recentemente ed inizialmente nel gatto e poi nel cane¹⁰⁻¹¹. Tuttavia, il ruolo patogeno di tali specie sulla cute degli animali non è conosciuto e sperimentalmente è stato dimostrato che non si verifica alcuna lesione se una grande quantità di un lievito lipidodipendente (e.g. *M. furfur*) è inoculata nel condotto uditivo esterno del cane³². Il ritrovamento di specie lipidodipendenti sulla cute o nel canale auricolare di cani asintomatici può comunque indicare il ruolo di questi animali come potenziali serbatoi di infezione per l'uomo. L'isolamento di lieviti lipidodipendenti dalla cute e dal canale auricolare dei cani indica, inoltre, la necessità di utilizzare terreni idonei (con supplementazione lipidica) nella routine diagnostica per la ricerca dei lieviti del genere *Malassezia*.

Infine, per quanto riguarda i criteri diagnostici, la ricerca dei lieviti del genere *Malassezia* richiede l'esecuzione dell'esame citologico e colturale anche se non è ancora stato chiarito quale di queste tecniche sia la più efficiente ed

attendibile⁷. L'esame citologico di rapida esecuzione, è uno dei metodi più comunemente impiegati per la diagnosi di otite e/o dermatite. Secondo alcuni Autori l'esame citologico dell'orecchio normale evidenzia un basso numero di microrganismi commensali^{32-37,38-39,40-41}. Per quanto riguarda *M. pachydermatis* i valori considerati normali e non indicativi di patologia sono un numero di cellule <10 per campo a 40X nell'orecchio e un numero di cellule <5 per campo a 40X negli altri siti cutanei^{7,21-42-43}.

I risultati del presente lavoro dimostrano che l'esame citologico ha una buona specificità ma una bassa sensibilità ossia maggiori possibilità di dare risultati falsi negativi e che, quando l'esame citologico è negativo, l'esame colturale può essere positivo sia nei soggetti sani che nei soggetti con lesione (15,7% e 28,8% rispettivamente). Le differenze (p<0,05) osservate nei due gruppi di animali risiedono nel numero di lieviti isolati: i.e. 69,94 UFC negli animali senza lesioni e 119,72 UFC negli animali con lesioni.

In conclusione l'esame citologico si è dimostrato un efficace strumento per la diagnosi di dermatite o di otite da *Malassezia* spp. quando si osservano rispettivamente 5 lieviti e 10 lieviti per campo a 40X.

Tuttavia, in presenza di otite o dermatite clinicamente attribuibili a *Malassezia* spp. e di un esame citologico negativo, è necessario effettuare un esame colturale per escludere un sospetto di infezione. Un numero superiore a 70 UFC, ottenuto mediante la procedura di prelievo impiegata nel presente lavoro, potrebbe essere indicativo di infezione da *Malassezia* spp.

L'esame colturale rappresenta un esame fondamentale non solo per confermare un sospetto di infezione ma consente di tipizzare le specie patogene e di scegliere una terapia appropriata soprattutto alla luce degli studi che hanno evidenziato sensibilità differente delle specie di *Malassezia* ai diversi farmaci antifungini⁴⁴⁻⁴⁵.

Parole chiave

Malassezia spp; prevalenza; distribuzione quantitativa; esame citologico; esame colturale.

Key words

Malassezia spp; occurrence; population size; cytological examination; mycological culture.

Bibliografia

1. Yarrow D, Ahearn DG: Genus 7: *Malassezia* Baillon. In: The Yeasts. A taxonomic study. Ed by NJW Kreger van Rij. Amsterdam, Elsevier Science Plubischers, 1984, pp 882-885.
2. Simmons RB, Guèho E: A new species of *Malassezia*. Mycol. 94: 1146-1149, 1990.
3. Guèho E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69 (4): 335-337, 1996.
4. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. J. Clin. Microbiol. 40: 1363-1367, 2002.
5. Sugita T, Takashima M, Kodama M, et al: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica* and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. 41: 4695-4699, 2003.

6. Hirai A, Kano R, Makimura K, et al: *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:623-7, 2004.
7. Guillot J, Bond R: *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med. Mycol.* 4: 72-73, 1999.
8. Cafarchia C, Otranto D: *Malassezia pachydermatis*: association between phospholipase production and skin lesions. *J. Clin. Microbiol.* 42 (10): 4868-4869, 2004.
9. Mason KV, Evans AG: Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27: 13-20, 1991.
10. Bond R, Howell SA, Haywood PJ, Lloyd DH: Isolation of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia globosa* from healthy pet cats. *Vet. Rec.* 141: 200-201, 1997.
11. Raabe P, Mayser P, Weib R: Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses.* 41: 493-500, 1998.
12. Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ: Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J. Clin. Microbiol.* 38 (6): 2383-2385, 2000 a.
13. Crespo EV, Ojeda Martos A, Vera Casano A, et al.: Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1263-1266, 2000 b.
14. Cafarchia C, Romito D, Otranto D, Puccini V: *Malassezia* in the external auditory meatus: a survey on a cat population in Apulia Region (Southern Italy). *Parassitologia* 44 (suppl. 1): 35, 2002.
15. Mickelsen PA, Viano-Paulson MC, Stevens DA, Diaz PS: Clinical and microbiological features of infection with *M. pachydermatis* in high risk infants. *J. Infect. Dis.* 157:1168, 1988.
16. Welbel SF, McNeil MM, Pramanik A, et al: Nosocomial *M. pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 104-108, 1994.
17. Guého E, Guillot J: Comment of *Malassezia* species from dogs and cats. *Mycoses.* 42: 673-674, 1999.
18. Bond R, Collin NS, Lloyd DH: Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *J. Small An. Pract.* 35: 68-72, 1994.
19. Kennis RA, Rosser EJ, Olivier NB, Walker RW: Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 208: 1048-1051, 1996.
20. Bensignor E, Jankowski F, Seewald W, et al: Comparison of two sampling technique to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of Basset Hounds. *Vet. Dermatol.* 13: 237-241, 2002.
21. Plant JD, Rosenkrantz WS, Griffin CE: Factor associated with and prevalence of high *M. pachydermatis* number on dog skin. *JAVMA* 201 (6): 879-882, 1992.
22. Van Abbe NJ: The investigation of dandruff. *J. Soc. Cosmet. Chemi.* 15: 609-630, 1964.
23. Midgley G, Guého E, Guillot J.: Disease caused by *Malassezia* species, In: *Microbiology and microbial infection.* Ed by L Ajello and RJ Hay. Arnold, London, United Kingdom, Topley & Wilson's. 1998, vol 4 pp. 201-211.
24. Guillot J, Guého E, Lesourd M, et al: Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J. Mycol. Med.* 6: 103-110, 1996.
25. Mayser P, Haze P, Papavassiliou 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.
26. 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. *J. Mycol. Med.* 41: 265-271, 1998.
27. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: Fungal skin disease. In: *Small Animal Dermatology*, 5th Ed by Muller and Kirk's. Philadelphia, Saunders WB, 1995, pp 329-391.
28. Guaguere E, Prelaud P: Etude rétrospective de 54 cas de dermite à *Malassezia pachydermatis* chez le chien: résultats épidémiologiques, cliniques, cytologiques et histopathologiques. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* 31:309-323, 1996.
29. Hajsig M, Tadic V, Lukman P: *Malassezia pachydermatis* u pasa: značajnosti nakih nalazista. *Veterinarski Arhiv* 55: 259-266, 1985.
30. Bond R, Saijonmaa-Foulumies L., Lloyd DH.: Population size and frequency of *M. pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J. Small. Anim. Pract.* 36: 147-150, 1995.
31. Noble WC, Sommerville DA: Method for examining the skin flora. In *Microbiology of human skin.* London, WB Saunders, 1974. 316-327.
32. Fraser G: The histopathology of the external auditory meatus of the dog. *J. Comp Pathol.* 71: 253-260, 1961.
33. Dufait R: Présence de *Malassezia pachydermatis* (syn *Pityrosporum canis*) sur les poils et les plumes des animaux domestiques. *Bull. Soc. Fr. Mycol Med.* 14: 19-22, 1985.
34. Morris DO: *Malassezia dermatitis* and otitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 29: 1303-1310, 1999.
35. Gustafson BA: Otitis externa in the dog. A Bacteriological and Experimental Study. Stockholm: Royal Veterinary College of Sweden, 1955.
36. Uchida Y, Mizutani M, Kubo T, et al: Otitis externa induced with *Malassezia pachydermatis* in dogs and the efficacy of pimaricin. *J. Vet. Med. Sc.* 54: 611-614, 1992.
37. Griffin CE: Otitis externa. *Comped Contin Ed Pract Vet.* 3: 741-749, 1981.
38. Chengappa MM, Maddux RL, Greer SC: A microbiologic survey of clinically normal and otitic canine ear canals. *Vet. Med Small Anim Clin.* 78: 343-344, 1983.
39. Macy DW, Seim HB.: Medical and surgical aspects of the ear. Parts I and II. 52nd Annual Meeting of the American Animal Hospital Association, 1985. 120-137.
40. Woody BJ, Fox SM: Otitis externa: Seeing past the signs to discover the underlying cause. *Vet. Med.* 81: 616-624, 1986.
41. Wilson JF: A practitioner's approach to complete ear canal. *Dermatol Reports.* 4: 1-8, 1985.
42. Griffin CE: Otitis externa and otitis media. In: *Current veterinary dermatology.* Ed by CE Griffin, Kwochka KW, MacDonald JM. St. Louis, Mosby Year Book. 1993, pp 245-262.
43. Scott DW: *Malassezia dermatitis* in the dogs. 12th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Dermatology, Barcellona, 1995.
44. Hammer KA, Carson CF, Riley TV: In vitro Activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and Melaleuca alternifolia (Tea tree) Oil against *Malassezia* species. *Antimicrobial Agents Chemother.* 467-469, 2000.
45. Nakamura Y, Kano R, Murai T, et al: Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2185-2186, 2000.