

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DEI LIEVITI DEL GENERE *MALASSEZIA* NEL CONDOTTO UDITIVO DI CANI E GATTI SANI E CON OTITE

CLAUDIA CAFARCHIA¹, GIOIA CAPELLI², DOMENICO OTRANTO¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari, (Italy) Str. prov.le per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano, Bari (Italy); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro - Padova

Riassunto

Il presente lavoro ha lo scopo di valutare la frequenza e la quantità delle diverse specie di *Malassezia* nel condotto uditivo esterno dei cani e dei gatti con e senza otite esterna. Da dicembre 2001 a dicembre 2003, sono stati esaminati clinicamente 107 animali sani (25 gatti e 82 cani) e 123 animali (48 gatti e 75 cani) con otite esterna. I campioni sono stati e sottoposti all'esame citologico e colturale per rilevare la presenza dei lieviti del genere *Malassezia*. La più alta frequenza (72,9% dei gatti, 57,3% dei cani) e il maggior numero di lieviti (59,6 unità formanti colonia -UFC per i gatti e 66,0 UFC per i cani rispettivamente) sono stati riscontrati in animali con otite. I lieviti sono stati isolati frequentemente dagli animali sotto i 5 anni di età e nei cani con orecchie pendenti. La più alta prevalenza dei campioni positivi è stata segnalata in inverno per i gatti e in autunno per i cani. Dei 413 isolati ottenuti dagli animali con e senza otite, 403 (97,6%) sono stati identificati come *Malassezia pachydermatis* e 10 (2,4%) come *Malassezia globosa*. Il maggior numero di UFC di *Malassezia* spp. rilevata in animali con otite, suggerisce il ruolo patogeno di tali lieviti nell'insorgenza delle lesioni. L'esame citologico risulta un buon metodo di diagnosi per l'otite da *Malassezia* quando sono presenti 10 cellule di lievito per campo a 40X. Un numero superiore a 18,22 UFC, con esame citologico negativo, può essere altresì indicativo di infezione da *Malassezia* spp.

Summary

The aim of this work is to observe the frequency of isolation, and the population size of *Malassezia* yeasts in the external ear canal of dogs and cats with and without otitis externa. From december 2001 to december 2003, 107 healthy animals (25 cats and 82 dogs) and 123 animals with chronic otitis externa (48 cats and 75 dogs) were clinically examined. Sterile cotton swabs were used to collect specimens from the external ear canal and culture tests and cytological examinations were performed. *Malassezia* were isolated from 72.9% and 40% of the cats and from 57.3% and 28.0% of the dogs, with and without otitis externa, respectively. *Malassezia* was frequently isolated from animals under 5 years of age. The highest prevalence of positive samples was reported in winter for cats and in autumn for dogs. Dogs with pendulous ears showed a statistically higher incidence of infection than dogs with erect ears. More *Malassezia* yeasts were recovered from animals with otitis (i.e. 59.6 colony forming units -CFUs for cats and 66.0 -CFUs for dogs) than from healthy animals. Out of the 413 isolates obtained from all animals, 403 (97.6%) were identified as *Malassezia pachydermatis* and 10 (2.4%) as *Malassezia globosa*. The largest population of *Malassezia* yeasts detected in animals with otitis suggest a likely role in the occurrence of lesions. Cytological examination is a good method for diagnosing otitis by *Malassezia* spp. When animals with otitis yield negative results to cytology, a fungal culture is required to rule out infection by *Malassezia* yeasts. It seems likely that a number in excess of 18.22 CFUs could be indicative of infection by *Malassezia* spp. when the cytological examination is negative.

INTRODUZIONE

I lieviti del genere *Malassezia* sono organismi lipofili commensali della cute dell'uomo e degli animali a sangue caldo che possono comportarsi da agenti patogeni opportunisti¹. Il genere comprende undici specie lipidodipen-

denti (cioè *Malassezia dermatis*, *Malassezia equi*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia sympodialis* e *Malassezia yamatoensis*) ed un'unica specie, *Malassezia pachydermatis*, che non necessita di lipidi per lo sviluppo in vitro²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸.

Le specie lipidodipendenti, fatta eccezione per *M. nana*, possono essere isolate dalla cute dell'uomo e sono associate a diverse malattie quali *Pityriasis versicolor*, follicolite, dermatite seborroica e, a volte, forme di dermatite atopica e persino infezioni sistemiche⁹. *Malassezia pachydermatis*

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 19/9/2005 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 28/2/2006”.

può essere isolata dalla cute e dalle mucose degli uccelli e dei mammiferi, ed in particolare dalla cute e/o orecchio di cani e gatti, in cui può causare dermatite e/o otite esterna cronica¹⁰. Recentemente *M. pachydermatis* è stata anche isolata dalla cute di proprietari di cani infetti¹¹ ed è stata segnalata come causa di infezioni nosocomiali nell'uomo¹²⁻¹³⁻¹⁴. Al contrario, alcune specie lipido-dipendenti quali, *M. furfur*, *M. globosa* e *M. sympodialis* sono state isolate dalle orecchie o dalla cute dei cani e dei gatti sani e malati¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹. La presenza e la frequenza di isolamento dei lieviti del genere *Malassezia* dalla cute e/o dalle orecchie di cani con e senza lesioni è ben documentata, mentre, i dati relativi ai gatti sono poco numerosi.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la quantità delle differenti specie di *Malassezia* nel condotto uditivo esterno dei cani e dei gatti con e senza otite esterna. L'efficacia dell'esame citologico quale strumento diagnostico di infezione da *Malassezia* è stata confrontata con quella dell'esame colturale.

MATERIALI E METODI

Prelievo del campione

Da dicembre 2001 a dicembre 2003, 230 animali (73 gatti e 157 cani) sono stati sottoposti ad esame clinico e raggruppati nel seguente modo:

Animali sani: 107 animali di proprietà (25 gatti e 82 cani) in buono stato di salute generale che non avevano avuto otite né subito trattamenti nei cinque mesi precedenti al prelievo. I gatti (25) di razza europea avevano età compresa fra i sei mesi ed i sei anni; 11 erano femmine e 14 maschi. I cani (82) meticci avevano età compresa fra sei mesi e 10 anni; 39 erano femmine e 41 maschi (per 2 cani il sesso non è stato riportato); 36 avevano orecchie con padiglioni auricolari pendenti e 46 orecchie con padiglioni dritti.

Animali con otite: 123 animali (48 gatti e 75 cani) con otite esterna diagnosticata clinicamente (i.e. prurito, presenza di cerume scuro e maleodorante) e presenza di segni clinici per più di un mese. I gatti (48) di razza europea avevano un'età compresa fra nove mesi e 10 anni; 21 erano femmine e 27 maschi. I cani (75) meticci avevano un'età compresa fra due mesi e nove anni; 39 erano femmine e 36 maschi, 47 avevano orecchie con padiglioni auricolari pendenti e 28 orecchie con padiglioni dritti. I campioni sono stati prelevati in doppio dal condotto uditivo esterno destro di ogni animale, mediante tamponi sterili. Nessuna malattia metabolica e/o endocrinopatia era stata segnalata durante l'anamnesi e né indagata negli animali con otite. Gli animali che presentavano otite causata da ectoparassiti sono stati esclusi dallo studio.

Esame colturale

I campioni, sono stati recapitati al laboratorio di Micologia della Sezione di Malattie Parassitarie della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari entro due ore dal prelievo, quindi seminati in piastre di Dixon Agar e posti a 32°C per 7 giorni²⁰⁻²¹. Di ogni campione positivo è stata effettuata una conta fino ad un massimo di 100 colonie per piastra ed i risultati sono stati espressi come numero di colonie per tampone (unità formanti colonia -UFC). Da ogni campio-

ne positivo sono state, inoltre, isolate quattro colonie che sono state sottoposte a successiva identificazione. *Malassezia pachydermatis* è stata identificata sulla base di caratteri morfologici e della capacità di svilupparsi anche in assenza di lipidi (crescita in Sabouraud destrosio agar, Biolife®).

Le specie lipido-dipendenti sono state identificate con il metodo dell'assimilazione del Tween (i.e. 20, 40, 60, 80) come precedentemente descritto³. Per la diagnosi di specie, sono state effettuate prove aggiuntive quali: catalasi, assimilazione del triptofano, del cremophor EL (castor oil) (Sigmaaldrich Milano, Italia) e dell'esculina²²⁻²³. I seguenti ceppi sono stati impiegati come riferimento: CBS 1878 per *M. furfur*, CBS 7222 per *M. sympodialis*, CBS 7956 per *M. sloffiae*, CBS 7966 per *M. globosa* e CBS 7876 per *M. obtusa*.

Esame citologico

Per ogni campione prelevato, è stato effettuato un esame citologico. Ogni tampone è stato rotolato su un vetrino portaoggetti, fissato sulla fiamma e colorato mediante colorazione di Diff-Quick e osservato al microscopio. I campioni sono stati considerati positivi quando sono state contate più di 10 cellule morfologicamente rapportabili a *Malassezia* spp. in cinque campi casuali ad ingrandimento 40X²⁴⁻²⁵⁻²⁶⁻²⁷.

Analisi statistica

I dati epidemiologici sono stati analizzati usando il modello di regressione multivariato per valutare possibili fattori di rischio associati alla presenza dei lieviti del genere *Malassezia*. Nella regressione logistica, la variabile dipendente è stata la positività per i lieviti del genere *Malassezia* mentre le variabili indipendenti sono stati i dati epidemiologici dei cani e dei gatti (es. sesso, età, stagione, presenza e/o assenza di lesioni) (Tab. 1)²⁸. Il T di Student è stato utilizzato per confrontare il valore medio di UFC registrato nei cani e nei gatti con e senza lesioni in funzione delle variabili epidemiologiche e in animali sani ed in animali con otite che presentavano un esame citologico negativo. La concordanza tra i risultati dell'esame citologico e dell'esame colturale è stata calcolata mediante il K statistico.

La sensibilità (Se) e la specificità (Sp) dell'esame citologico sono state calcolate, usando come gold standard i risultati dell'esame colturale. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Il software usato è stato SPSS (versioni 11.5, 2001) e WinEpiscope 2.0 (accessibile in linea a <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope/>).

RISULTATI

La prevalenza dei lieviti del genere *Malassezia* rispetto alle variabili epidemiologiche è riportata in Tabella 1. La quantità dei lieviti del genere *Malassezia*, espressa come UFC in cani e gatti con e senza otite rispetto alle variabili epidemiologiche è riportata in Tabella 2. Un maggior numero di lieviti del genere *Malassezia* è stato rilevato in animali con otite (i.e. UFC medio: 59,6 per i gatti e 66,0 per i cani) rispetto agli animali sani ($p < 0,05$). Nei gatti, un più alto numero di lieviti, rispetto a quello registrato in animali sani, è stato evidenziato nei maschi, nei soggetti superiori all'anno di età e durante l'autunno. Per quanto riguarda i cani, una maggiore densità di carica, rispetto a quella registrata negli

Tabella 1
Prevalenza di *Malassezia* spp. nei gatti e nei cani, in relazione alle variabili epidemiologiche

Dati	Cani		Gatti		
	n	pos (%)	n	pos (%)	
Otite	Si	75	43 (57,3) ^a	48	35 (72,9) ^b
	No	82	23 (28,0) ^a	25	10 (40,0) ^b
Stagione	Autunno	43	21 (48,8)	24	14 (58,3) ^c
	Inverno	50	23 (46,0)	27	20 (74,1) ^c
	Primavera	44	18 (40,9)	13	6 (46,2) ^c
	Estate	15	4 (26,7)	9	5 (55,6) ^c
Età	< 1	34	14 (41,2)	31	23 (74,2) ^d
	1-5	96	41 (42,7)	31	18 (58,1) ^d
	>5	27	11 (40,7)	11	4 (36,4) ^d
Sesso	Femmina	78	33 (42,3)	32	17 (53,1)
	Maschio	77	32 (41,6)	41	28 (68,3)
Padiglioni auricolari	Dritti	74	23 (31,1) ^e		
	Pendenti	83	43 (51,8) ^e		
Totale		157	66 (42,0)	73	45 (61,6)

^{a-e}: Analisi multivariata. Le differenze significative ($p < 0,05$) sono indicate con la stessa lettera.

animali sani, è stata evidenziata nei maschi, nei cani di età inferiore ad un anno, durante l'inverno ed in animali con padiglioni auricolari pendenti. Dei 413 isolati ottenuti dagli animali con e senza otite, 403 (97,6%) sono stati identificati come *M. pachydermatis* e 10 (2,4%) come *M. globosa*. *Malassezia globosa* è stata isolata in colture miste con *M. pachydermatis* in tre gatti (due con otite ed uno senza) e in coltura pura in un singolo gatto con otite.

I risultati ottenuti dal confronto tra esame citologico ed esame colturale, in termini di concordanza, sensibilità e specificità, calcolata su 228 campioni, sono riportati in Tabella 3. L'esame citologico mostra una moderata concordanza con i risultati dell'esame colturale prendendo in considerazione tutti gli animali con e senza otite. L'esame citologico mostra una buona specificità (non meno del 97%, cioè un basso numero di falsi positivi) associato ad una bassa sensibilità (circa 30% cioè alto numero di falsi negativi). Il numero di lieviti del genere *Malassezia* registrato in animali sani (cani e gatti) e con otite che presentavano un esame citologico negativo è risultato 18,24 UFC e 38,82 UFC per tampone, rispettivamente.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il ruolo patogeno di *Malassezia* spp. sulla cute dei cani è ben documentato e la prevalenza con cui tali lieviti sono isolati dal mantello e/o dalle orecchie di tali animali varia a seconda della presenza delle lesioni. Alcuni autori riportano una più elevata frequenza di isolamento di tali lieviti in cani con lesioni rispetto a quella registrata in animali sani²⁹⁻³⁰. Nel presente studio la frequenza di isolamento dei lieviti registrata in cani con e senza lesioni è paragonabile a quella

registrata nei precedenti studi³⁰⁻³¹ e nei cani con lesioni è significativamente più alta di quella registrata in cani sani.

I lavori che documentano la presenza di tali lieviti ed il loro ruolo patogeno nel canale auricolare dei gatti, sono poco numerosi. La frequenza di isolamento dei lieviti del genere *Malassezia* registrata in precedenti studi è solitamente molto bassa (41,2% nei gatti con otite e 17,6% nei gatti sani) e sicuramente molto più bassa di quella registrata nei cani (62,2% nei cani con otite e 50% nei cani sani)¹⁵⁻³¹⁻³². Nel presente studio, invece, un'elevata frequenza di isolamento è stata registrata nei gatti, ed essa risulta più elevata di quella registrata nei cani. La più alta frequenza e il maggior numero dei lieviti del genere *Malassezia* riscontrati in animali con otite, rispetto agli animali sani indica che *Malassezia* spp. prolifera nei siti di infiammazione e svolge un ruolo nella patogenesi dell'otite esterna. Le modalità d'azione patogena dei lieviti sono tuttavia ancora poco conosciute; di certo si sa che l'adesione alle cellule dello strato corneo dell'epidermide permette loro di resistere ai meccanismi fisici di difesa messi in atto dall'ospite³³ e che la proliferazione del lievito rappresenta la fase preliminare per indurre la patologia¹⁵⁻²⁹⁻³⁰ così come la produzione di particolari enzimi quali le fosfolipasi³⁴. Le condizioni favorevoli alla crescita del lievito non sono completamente note ma due sembrano essere quelle più importanti: le alterazioni del sistema immunitario e i cambiamenti del microambiente cutaneo¹⁰⁻³³⁻³⁵⁻³⁶⁻³⁷⁻³⁸. Le condizioni morbose che determinano danni alla barriera cutanea e favoriscono la patologia da *Malassezia* sono rappresentate da dermatiti atopiche, infezioni parassitarie e disordini della cheratinizzazione¹⁰⁻³³⁻³⁵⁻³⁶⁻³⁷⁻³⁸. Le alterazioni del sistema immunitario sono inoltre associate a fenomeni di ipersensibilità ed endocrinopatie³³.

Tabella 2

Distribuzione quantitativa di *Malassezia* spp. in gatti e cani con e senza otite in relazione alle variabili epidemiologiche (ds= deviazione standard)

Dati	Gatti				Cani			
	Sano		Con otite		Sano		Con otite	
	Esaminati	UFC Medio (ds)	Esaminati	UFC Medio (ds)	Esaminati	UFC Medio (ds)	Esaminati	UFC Medio (ds)
Animali	10	23,2 (27,6) ^a	35	59,6 (36,0) ^a	23	42,1 (33,4) ^b	43	66,0 (41,7) ^b
Sesso								
Femmina	4	36,0 (43,3)	13	44,7 (31,9)	12	42,7 (33,3)	21	64,9 (43,9)
Maschio	6	15,0 (5,5) ^c	22	67,3 (36,4) ^c	11	39,1 (37,3) ^d	21	68,4 (41,2) ^d
Età								
<1	3	46,7 (46,2)	20	57,50 (36,1)	5	9,60 (10,2) ^f	9	60,00 (47,7) ^f
1-5	7	13,4 (6,5) ^e	11	61,9 (36,1) ^e	15	40,1 (31,3)	26	62,7 (41,0)
>5	0	0	4	57,0 (30,9)	3	74,7 (33,3)	8	87,6 (35,0)
Stagione								
Autunno	5	10,8 (5,7) ^g	9	49,7 (34,5) ^g	4	34,0 (36,9)	17	53,1 (42,9)
Inverno	5	36,0 (35,8)	15	56,6 (35,9)	16	31,31 (28,2) ^h	7	92,4 (20,0) ^h
Primavera	0		6	68,3 (36,0)	3	79,0 (36,4)	15	74,1 (40,5)
Estate	0		5	78,0 (38,9)	0		4	52,7 (54,7)
Padiglioni auricolari pendenti								
Dritti					14	33,1 (32,9) ⁱ	29	66,1 (43,9) ⁱ
					9	45,7 (34,5)	14	61,2 (40,9)

^{a-i}: Student t test- Le differenze statisticamente significative (p<0,05) sono indicate con la stessa lettera.

Tabella 3

Confronto fra i risultati dell'esame culturale ed esame citologico di animali con e senza otite e tutti gli animali. Sono segnalate inoltre anche la sensibilità (Se) e la specificità (Sp) dell'esame citologico confrontato con l'esame culturale

TEST	Esame culturale			Confronto	Se-Sp
Esame citologico	neg	pos	Totale	k (p value)	
Animali senza otite					
neg	76	21	97	0,47 (0,00)	32,2%- 100%
pos	0	10	10		
totale	76	31	107		
Animali con otite					
neg	46	26	72	0,47 (0,00)	64,8% - 97,8%
pos	1	48	49		
totale	47	74	121		
Tutti gli animali					
neg	122	47	169	0,51 (0,00)	55,2% - 99,1%
pos	1	58	59		
totale	123	105	228		

Nel presente studio, non avendo considerato alcun animale affetto dalle patologie sopra menzionate, il tipo di orecchie è risultato l'unico fattore di rischio di infezione in quanto la presenza di padiglioni auricolari pendenti può creare un habitat favorevole per lo sviluppo di questo lievito³⁹.

Lo studio dei fattori di rischio relativi alla presenza dei lieviti del genere *Malassezia* nei gatti, non è mai stato effettuato in precedenza. Dai risultati del presente lavoro, l'età e la stagione risultano fattori predisponenti alle infezioni da *Malassezia* spp. nei gatti.

Per quanto riguarda la distribuzione quantitativa, un maggiore numero di lieviti è stato isolato in gatti maschi superiori all'anno di età, in autunno rispetto a quella registrata in animali sani. Nei cani invece, una maggiore densità di carica rispetto a quella di animali sani, è stata registrata in cani maschi di età inferiore ad un anno, in inverno ed in cani con orecchie pendule. Poiché la proliferazione dei lieviti è considerata uno dei fattori preliminari nell'insorgenza di otite da *Malassezia* spp.¹⁵⁻²⁹⁻³⁰, si può supporre che questi gruppi di animali siano più esposti all'infezione ed allo sviluppo dell'otite da *Malassezia* spp.

Malassezia pachydermatis risulta la specie più frequentemente isolata dal condotto uditivo esterno dei cani e dei gatti con e senza otite mentre il rilievo di *M. globosa* in gatti con e senza otite, è prima nel suo genere. L'isolamento di *M. globosa* in coltura pura in gatti con otite permette, inoltre, di ipotizzare che tale lievito svolga un ruolo nella induzione dell'infezione. La presenza delle specie lipido-dipendenti nei carnivori è stata recentemente dimostrata, inizialmente nei gatti¹⁵ e successivamente nei cani¹⁶⁻²⁹. L'isolamento di specie lipido-dipendenti dai gatti permette di ipotizzare che questi animali svolgano un ruolo epidemiologico come "reservoirs" per l'uomo.

L'esame citologico ha mostrato una buona specificità ma una bassa sensibilità ed una concordanza moderata con i risultati ottenuti dall'esame colturale sia nei cani che nei gatti, con e senza lesioni. È stato possibile quindi osservare campioni che presentavano esami citologici negativi ma un esame colturale positivo, sia in animali con che senza otite. Una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) è stata osservata nei due gruppi, riguardo al numero di lieviti isolati (i.e. 38,34 UFC negli animali con otite e 18,22 UFC in quelli sani). In conclusione, l'esame citologico si è dimostrato un efficace strumento per la diagnosi di otite da *Malassezia* spp. quando sono stati osservati 10 lieviti per campo a 40X, ma, in presenza di otite attribuibile a *Malassezia* spp. ed in presenza di un esame citologico negativo, è necessario effettuare un esame colturale per escludere un sospetto di infezione. In particolare, un numero superiore a 18,22 UFC, ottenuto mediante la procedura di prelievo impiegata nel presente studio, potrebbe essere indicativo di otite da *Malassezia* spp.

Parole chiave

Gatti, cani, *Malassezia globosa*, *Malassezia pachydermatis*, otite, fattori di rischio.

Key words

Cats, dogs, *Malassezia globosa*, *Malassezia pachydermatis*, otitis, risk factors.

Bibliografia

- Guillot J, Guèho E, Mialot M, Chermette R: Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. Le Point Veterinaire 29: 21-31, 1998.
- Guèho E, Midgley G, Guillot J: The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 69: 337-335, 1996.
- Guillot J, Guèho E, Lesourd M, et al: Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 6: 103-110, 1996.
- Simmons RB, Guèho E: A new species of *Malassezia*. Mycol 94: 1146-1149, 1990.
- Nell A, James SA, Bond CJ, et al: Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. Vet Rec 150: 395-398, 2002.
- 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.
- 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: 623-627, 2004.
- Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al: A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 48(8):579-83, 2004.
- Guèho E, Boekhout T, Ashbee HR, et al: The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol 36: 220-229, 1998.
- Guillot J, Bond R: *Malassezia pachydermatis*: a review. Med Mycol 4: 72-73, 1999.
- Morris DO: *Malassezia dermatitis* and otitis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 29: 1303-1310, 1999.
- 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 157:1163-1168, 1988.
- 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.
- Chang HJ, Miller HL, Watkins N, et al: An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. N Engl J Med 338: 706-711, 1998.
- 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.
- 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.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ: Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. J Clin Microbiol 38: 2383-2385, 2000.
- 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.
- Nardoni S, Manciant F, Corazza M, Rum A: Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs Mycopathologia 157: 383-388, 2004.
- Midgley G: The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) Yeast in vivo and in vitro. Mycopathologia 106: 143-153, 1989.
- 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.
- 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.
- Mayser P, Wille G, Imkamp A: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. Mycoses 41: 265-271, 1998.
- Griffin CE: Otitis externa and otitis media. In: Griffin C. E, Kwochka K. W, MacDonald J. M. (eds). Current Veterinary Dermatology. St. Louis: Mosby Year Book, 1993, pp 245-262.
- Rausch FE, Skinner GW: Incidence and treatment of budding yeasts in canine otitis externa. Moderne Veterinary Practice 59: 914-915, 1978.
- 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.
- Ginel PJ, Lucena R, Rodriguez JC, Ortega J: A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats Vet Dermatol., 13(3):151-6, 2002.
- Hosmer DW, Lemeshow S: Applied Logistic Regression, 2nd edn. New York: Wiley & Sons, 2000.
- 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 Diag 17(4): 316-322, 2005.
- 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.
- Hajsig M, Tadic V, Lukman P: *Malassezia pachydermatis* u pasa: značajnosti nakih nalazista. Veterinarski Arhiv 55: 259-266, 1985.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ: Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. Med Mycol 40: 115-121, 2002.
- Chen TA, Hill PB: The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease Vet Dermatol 16(1): 4-26, 2005.
- Cafarchia C, Otranto D: Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. J Clin Microbiol 4868-4869, 2004.
- Green CE: Integumentary infection In: Green CE eds. Infection Diseases of Dogs And Cats, 2nd edn. Philadelphia: WB Saunders, 1998, pp 547-554.
- Rasychuk RAW, Lutgen P: Diseases of the ear. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. 5th edn. Philadelphia: WB Saunders, 2000, pp 986-1002.
- Scott DW, Miller WH. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 5th edn. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
- Morris DO: *Malassezia dermatitis* and otitis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 29: 1303-1310, 1999.
- Carlotti DN, Taillieu-Le Roy S: L'otite externe chez le chien: etiologie et clinique, revue bibliographique et étude rétrospective portant sur 752 cas. Prat Med Chir Anim Comp 32: 243-257, 1997.