



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO SCIENZE CLINICHE VETERINARIE
CICLO XXIII

**ASPETTI CLINICI ED EZIOPATOGENETICI DELLA
DERMATITE ED OTITE DA *Malassezia* sp.
NEL CANE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola

Supervisore: Dott.ssa Helen Poser

Dottorando: dott. Michele Berlanda

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	5
INFORMAZIONI GENERALI E STORICHE	5
TASSONOMIA.....	8
COMMENSALISMO.....	9
HABITAT E FATTORI PREDISPONENTI.....	11
CARATTERI MORFOLOGICI	15
RIPRODUZIONE	15
BIOCHIMICA	16
IMMUNOLOGIA	20
<i>Introduzione.....</i>	<i>20</i>
<i>Risposta immunitaria aspecifica</i>	<i>21</i>
<i>Le componenti cellulari.....</i>	<i>22</i>
<i>Liberazione degli antigeni, penetrazione e presentazione.....</i>	<i>24</i>
<i>Risposta immunitaria cellulo-mediata.....</i>	<i>25</i>
<i>Risposta anticorpale a Malassezia (IgM, IgG, IgA)</i>	<i>29</i>
<i>Risposta IgE specifica.....</i>	<i>33</i>
<i>Risposta mastocitaria</i>	<i>36</i>
<i>Risposta epidermica alla dermatite da Malassezia spp.....</i>	<i>39</i>
LA DERMATITE DA MALASSEZIA	40
<i>Caratteristiche cliniche</i>	<i>40</i>
<i>Diagnosi</i>	<i>42</i>
<i>Istopatologia della dermatite da Malassezia</i>	<i>46</i>
<i>Terapia</i>	<i>47</i>
POTENZIALE ZOOTOTICO	51
OBIETTIVI	55

MATERIALI E METODI.....	57
ANIMALI.....	57
CAMPIONAMENTO.....	60
ESAME CITOLOGICO.....	61
ESAME COLTURALE.....	61
DIAGNOSI MEDIANTE METODICA DI BIOLOGIA MOLECOLARE.....	62
ANALISI DEI DATI.....	62
RISULTATI.....	63
DISCUSSIONE.....	87
CONCLUSIONI ED IMPLICAZIONI.....	97
BIBLIOGRAFIA.....	99

RIASSUNTO

I lieviti appartenenti al genere *Malassezia* sono organismi commensali della cute umana ed animale che in talune condizioni predisponenti possono diventare patogeni. Obiettivo del presente lavoro è stato di approfondire le conoscenze di alcuni aspetti clinici ed eziopatogenetici di dermatite ed otite da *Malassezia* sp. nel cane. Per raggiungere tali obiettivi sono stati messi a confronto i risultati ottenuti da un gruppo di controllo e quelli di tutti gli animali che sulla base della visita clinica e degli esami citologici sono stati riconosciuti affetti da sovraccrescita di *Malassezia* sp. In tutti i soggetti, dopo visita dermatologica, sono state campionate tre regioni standard (ascella, interdigitale, padiglione) ed una coinvolta da lesioni. Di tali regioni è stato eseguito l'esame citologico per l'identificazione e la conta dei lieviti. Nei casi di positività citologica sono stati eseguiti l'esame colturale, l'identificazione fenotipica e genotipica.

Sono stati inclusi 97 animali di cui 84 affetti da sovraccrescita di *Malassezia* sp. Fra questi le razze maggiormente rappresentate sono state il pastore tedesco, il Labrador ed il boxer (10/11,9%; 6/7,1%; 5/5,9%, rispettivamente); le femmine sono risultate in numero superiore ai maschi (50 vs 34).

Un elevato numero di pazienti (32/44,5%) non aveva ricevuto, in precedenza alla visita, alcuna terapia farmacologica. I risultati non escludono che la somministrazione di antibiotici e/o cortisonici possa avere un'influenza parziale sulla sovraccrescita di *Malassezia* sp.

Negli animali malati la maggior frequenza d'isolamento si è avuta nel condotto uditivo esterno (33/46,5%), seguito dalle regioni coinvolte da lesioni (31/43,7%) e dagli spazi interdigitali (29/40,8%).

La maggior numerosità dei lieviti riscontrata con esame citologico nei cani malati rispetto ai sani sembra essere uno dei fattori sostanziali per lo sviluppo dei segni clinici della dermatite da *Malassezia*.

I risultati ottenuti dal confronto fra la citologia e l'esame colturale appaiono in disaccordo con quanto affermato in letteratura. L'esame citologico, realizzato con la tecnica del nastro adesivo e colorato con la tecnica Diff-Quick® modificata, sembra maggiormente sensibile nel rilevare una sovraccrescita di *Malassezia* rispetto all'esame colturale ottenuto secondo la tecnica adottata in questo studio.

L'unica specie del genere *Malassezia* isolata nel presente lavoro è stata *Malassezia pachydermatis*.

È auspicabile che in futuro, ulteriori informazioni possano giungere dall'approfondimento di aspetti clinici correlati al genotipo dei lieviti e dell'ospite per chiarire definitivamente gli aspetti irrisolti dell'eziopatogenesi della dermatite da *Malassezia*.

ABSTRACT

Malassezia spp. yeasts are commensal organisms of human and animal skin and occasionally act as pathogens.

The aim of this study was to get a further insight into pathogenetic and clinical aspects of *Malassezia* dermatitis and otitis in the dog through a comparison between patients with *Malassezia* overgrowth to those of a control group. All animals enrolled in the study were presented at the Department of Veterinary Clinical Science for a dermatological consultancy.

After a complete physical and dermatologic examination, samples were obtained from four regions: axilla, interdigital area, ear pinna and one skin lesion.

Citology was performed from the above regions in order to identify and count yeasts. In positive cases a yeast culture, phenotypic and genotypic identification were carried out.

Ninety-seven animals were enrolled in the study: 84 patients with *Malassezia sp.* overgrowth and 13 healthy dogs. German shepherd, labrador and boxer were overrepresented among breeds (10/11,9%; 6/7,1%; 5/5,9%, respectively) and females were more than males (50 vs 34).

The history of most patients (32/44,5%) revealed that they have not received any medication before examination. In fact, antibiotic or steroid therapy may affect *Malassezia* overgrowth in some way but there is still not enough evidence to confirm it.

In affected patients parasites were isolated more often from external auditory canal (33/ 46,5%), skin lesions (31/43,7%) and interdigital areas (29/40,8%).

The number of yeasts resulting from the skin cytology seems to be the most important predisposing factor for the clinical presentation of *Malassezia* dermatitis as evidenced by the comparison between pathological and healthy dogs.

The cytology, performed following the technique of the adhesive tape strips and stained with modified Diff-Quick®, seems to be more sensitive in detecting an overgrowth of *Malassezia* than culture. This result is in disagreement with previous studies.

The only species of the genus *Malassezia*, isolated in the present study, was *Malassezia pachydermatis*.

Further studies on yeast and host genotype could provide new insights into the etiopathogenetic aspects of *Malassezia* dermatitis and otitis in the dog.

INTRODUZIONE

INFORMAZIONI GENERALI E STORICHE

La dermatite da *Malassezia* è una malattia sostenuta da *Malassezia pachydermatis*, lievito lipofilo che si riproduce per gemmazione e che appartiene alla normale microflora della cute e delle mucose del cane.

Il genere *Malassezia* comprende quattordici specie di lieviti saprofiti, la maggior parte dei quali, in determinate condizioni di alterato microclima cutaneo o variata immunità dell'ospite (Scott *et al.*, 2001), possono diventare patogeni per l'uomo e per gli animali.

La tassonomia e la nomenclatura dei lieviti inseriti nel genere *Malassezia* furono sempre notevolmente controverse fin dalla prima descrizione di Eichstedt nel 1846 che attribuì ruolo patogeno ad alcuni lieviti osservati sulle scaglie di pazienti affetti da *pityriasis versicolor*. Nel 1853 Robin assegnò a tali microrganismi il nome di *Microsporum furfur* in quanto, per la presenza di filamenti associati alle spore, li ritenne una nuova specie di dermatofiti; nel 1889 il nome fu mutato in *Malassezia furfur*. Contemporaneamente Malassez descrisse dei lieviti di forma ovalare, non associati alla produzione di ife, ai quali conferì il nome di *Pityrosporum malassezii*. Solamente nel 1927 i due organismi saranno riconosciuti come due forme dello stesso genere (Panja, 1927) e nel 1986 infine, saranno rinominati *Malassezia furfur* dalla Commissione Internazionale sulla Tassonomia dei Funghi (Cannon, 1986).

Nel frattempo grazie agli studi di Gordon del 1951 e di Salkin e Gordon si riuscì a dimostrare la natura dimorfica di *Malassezia* che associa fasi del ciclo in forma di lievito e fasi in forma di ifa (Salkin e Gordon, 1977).

M. pachydermatis fu identificata per la prima volta nel 1925 da squame cutanee di un rinoceronte con una dermatite esfoliativa generalizzata (Weidman, 1925). A causa della somiglianza con *Pityrosporum ovale* nonostante le dimensioni minori fu proposto il nome di *Pityrosporum pachydermatis*.

Negli anni '50 Gustafson osservò dei lieviti attribuibili per le loro caratteristiche al genere *Pityrosporum*, i quali però si differenziavano per non necessitare di lipidi per la crescita in vitro. Lo studioso svedese diede loro il nome di *Pityrosporum canis*.

Lo stesso autore evidenziò il ruolo svolto da tali lieviti nelle otiti esterne del cane e dimostrò la possibilità di causare otite inoculandoli all'interno di un condotto uditivo esterno sano.

Successivamente altri autori (Fraser, 1961) osservarono e descrissero dei ceppi di lieviti non lipido dipendenti dal canale auricolare di cani e gatti sani, corrispondenti a quelli studiati in precedenza da Gustafson (1950).

Solo nel 1986 sarà messo ordine nella classificazione di tali lieviti ai quali sarà assegnato il nome di *Malassezia pachydermatis*.

Dal 1990 la diffusione delle tecniche di genetica molecolare ha permesso di rendere maggiormente chiara la classificazione del genere *Malassezia* (Chen e Hill, 2005) che sarà illustrata nel prossimo capitolo.

Nel cane la specie più frequentemente isolata è *Malassezia pachydermatis*, la quale, si può ritrovare sia in animali sani, più frequentemente nella regione perianale, interdigitale ed auricolare (Girão *et al.*, 2006; Cafarchia *et al.*, 2005a,b), sia in animali con dermatite e/o otite. Più raramente si può riscontrare anche nelle cavità nasali ed in vagina.

Alcuni lavori recenti (Cabañes *et al.*, 2007; Crespo *et al.*, 2000) hanno inoltre isolato anche nel cane, e non più solo nell'uomo, specie di *Malassezia* lipido-dipendenti quali *M. slooffiae*, *M. furfur* e *M. sympodialis*, il cui ruolo patogeno è a tutt'oggi da definire.

Negli ultimi anni la segnalazione di dermatopatie da *Malassezia* spp., ed i lavori scientifici al riguardo, sono in costante aumento. Tuttavia, mentre il rapporto tra lieviti e specie ospiti è stato ampiamente studiato nell'uomo (Ashbee ed Evans, 2002), nel cane restano ancora molti punti da chiarire.

I fattori coinvolti nel passaggio da commensalismo a parassitismo non sono ancora completamente compresi. Non è ancora chiaro, infatti, se a determinare la patologia sia la predisposizione dell'ospite oppure fattori legati al parassita.

I processi coinvolti nella colonizzazione ed infezione della cute includono l'adesione del lievito allo strato corneo, la secrezione di enzimi, comprendenti lipasi, fosfolipasi, aspartil proteasi e sfingomielinasi acide come anche fattori legati alla risposta immunitaria dell'ospite (Bond, 2010).

Questi enzimi sono ritenuti responsabili dell'azione di rottura della barriera epidermica la quale causa modificazioni del microambiente cutaneo e permette il contatto fra gli antigeni del lievito ed il sistema immunitario dell'ospite (Chen e Hill, 2005).

Uno dei punti più importanti che meritano approfondimento è il ruolo svolto da *Malassezia sp.* nella dermatite atopica del cane; studi recenti condotti da Nardoni e colleghi (2007) hanno rilevato che in questi animali si riscontra sovente una sovraccrescita di lieviti, anche in assenza di lesioni.

Inoltre alcuni studi hanno suggerito che questo lievito possa modulare le risposte del sistema immunitario dei pazienti atopici umani (Ashbee, 2006) ed animali (Chen *et al.*, 2002b; Nuttal e Halliwell, 2001).

È ancora da chiarire, infine, quanta parte della sintomatologia clinica della dermatite da *Malassezia sp.* sia da attribuire ad una ipersensibilità specifica (Scott *et al.*, 2001).

Il manifestarsi di frequenti recidive, soprattutto negli animali atopici, è ancora da dimostrare se sia legato a fattori immunitari dell'ospite o a possibili resistenze agli antimicotici.

TASSONOMIA

Inizialmente il genere *Malassezia* comprendeva sette specie di lieviti: *M. furfur*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia globosa*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia sympodialis*, *M. pachydermatis* e *Malassezia restricta*; negli ultimi anni sulla base di riscontri biochimici, morfologici biologici e molecolari sono state inserite nel genere sette nuove specie: *Malassezia dermatis*, *Malassezia equina*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia caprae* e *Malassezia cunicoli* (Cabañes *et al.*, 2010).

Le quattordici specie attualmente descritte possono essere discriminate fra loro utilizzando i metodi fenotipici tradizionali. Tali metodi, per il genere considerato, comprendono l'identificazione morfologica e le caratteristiche biochimiche. In particolare per la valutazione delle seconde si utilizzano il test della catalasi, l'abilità di assimilazione dei Tween (poliossietilen sorbitani, tensioattivi non ionici idrosolubili) la crescita su un terreno additivato con *castor oil*, l'attività betaglucosidasi e l'abilità nel produrre pigmenti e fluorocromi in presenza di triptofano.

Per le caratteristiche di lipido-dipendenza che caratterizzano tutte le specie del genere, ad eccezione di *M. pachydermatis*, la semplice verifica della possibilità di crescita su terreni non additivati di lipidi permette di distinguere quest'ultima specie da tutte le altre.

Nonostante la numerosità dei test eseguibili per la discriminazione fra specie, il recente riscontro (Cafarchia *et al.*, 2011a; Cafarchia *et al.*, 2007) di ceppi di lieviti con caratteristiche biochimiche e di crescita atipiche, pone in dubbio la reale utilità di tali test e suggerisce di rivolgersi per il futuro all'identificazione molecolare.

Le tecniche d'indagine molecolare, inoltre, hanno già permesso di comprendere come all'interno delle singole specie vi siano differenti genotipi, forse espressione di variabilità dell'ospite, della regione corporea analizzata o dei trattamenti

antimicotici utilizzati (Cafarchia *et al.*, 2011a).

COMMENSALISMO

Malassezia sp. come gli altri commensali della cute svolge il suo intero ciclo vitale sulla superficie cutanea. Ogni individuo acquisisce i commensali della cute nei primi giorni di vita, in particolare dalla madre, molto probabilmente attraverso la desquamazione cutanea (Mason *et al.*, 1996).

L'ospite tollera la presenza dei commensali poiché la loro presenza in alcuni casi evita che altri microorganismi patogeni si insedino nella stessa nicchia ecologica (Scott *et al.*, 2001).

Solo in seguito al suo isolamento in un caso di dermatite in un rinoceronte ci si rese conto che i lieviti del genere *Malassezia* fanno parte della flora commensale della cute di mammiferi ed uccelli (Weidman, 1925).

Numerosi sono gli ambiti nei quali si esplica l'interazione fra ospite e commensale ma ne citeremo solo alcuni, rilevanti per la specie di nostro interesse.

I lipidi presenti sulla cute dell'ospite possono svolgere contemporaneamente due ruoli, quello di formare una barriera fisica ed allo stesso tempo favorire i microrganismi lipofili, come alcuni lieviti del genere *Malassezia* (Mason *et al.*, 1996).

Oltre ai normali costituenti della cute alcuni lipidi sono prodotti dall'attività enzimatica degli organismi commensali, in particolare per *Malassezia spp.* ma ciò avviene anche nel caso degli stafilococchi, tali prodotti enzimatici sono in grado di limitare lo sviluppo di organismi concorrenti (Fraser, 1961).

Questo, come altri dei prodotti di *Malassezia* rappresentano fattori di virulenza che possono danneggiare l'ospite stesso ed innescare la patologia.

La produzione enzimatica ed il suo ruolo nella patogenicità del lievito sarà affrontata nel prossimo capitolo.

Un altro aspetto interessante nel rapporto ospite-commensale riguarda il pH della cute. Il cane, dagli studi presenti in letteratura, fra gli animali domestici è la specie animale con il pH più elevato con un valore variabile da 5,5 a 8,2 secondo gli studi analizzati ed una media di 7,52 (Roy *et al.*, 1954; Draize *et al.*, 1942); *Malassezia pachydermatis* viene isolata più comunemente da regioni corporee a pH elevato, come ad esempio il condotto uditivo esterno.

Fra le strategie adottate dall'ospite per limitare la popolazione dei commensali citeremo qui brevemente la proliferazione cellulare. In uno studio eseguito su lieviti del genere *Candida* fu dimostrato che tali organismi sono in grado di indurre un aumento dell'indice mitotico in vitro (Sohnle *et al.*, 1978) e questo spiegherebbe l'effetto di desquamazione osservato in vivo in numerose patologie dermatologiche fra cui anche la dermatite da *Malassezia*.

In un vecchio studio del 1980 fu rilevato che *Malassezia* è in grado attraverso la produzione di alcune sostanze di attivare la cascata del complemento (Rosenberg *et al.*, 1980).

Ciò può innescare il processo flogistico e un danno alla barriera epidermica con aumento della perdita d'acqua e dell'umidità a livello cutaneo. Tale aumento di umidità favorisce ulteriormente la moltiplicazione del lievito (Mason *et al.*, 1996).

Si può quindi comprendere come la sovraccrescita di un commensale rappresenti la rottura di un delicato equilibrio nel quale l'ospite ed il commensale svolgono entrambi ruoli specifici.

HABITAT E FATTORI PREDISPONENTI

In contrasto con quanto accade per numerosissimi batteri e lieviti, *Malassezia sp.* è stata riscontrata raramente nell'ambiente. Il suo habitat rimane quindi primariamente la cute e le mucose di mammiferi ed uccelli.

Sebbene considerati tipicamente organismi commensali, i lieviti hanno suscitato recente interesse per la loro capacità di causare malattia in caso d'interruzione della barriera chimico-fisica o immunologica dell'ospite (Cafarchia e Otranto, 2004).

Dalla cute dell'uomo è frequente isolare specie di *Malassezia* lipido-dipendenti quale ad esempio *M. furfur*, mentre l'unica specie non lipido-dipendente, *M. pachydermatis*, viene isolata in percentuali intorno al 10 % (Bandhaya, 1993)

Nel cane, in tutti i lavori che hanno considerato approfonditamente tale aspetto (Yurayart *et al.*, 2011; Machadfo *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2009; Cafarchia *et al.*, 2005a,b; Cafarchia e Otranto, 2004; Nardoni *et al.*, 2004), *Malassezia pachydermatis* è la specie più frequentemente isolata.

L'unico isolamento di *M. furfur* nel lavoro di Machado e colleghi del 2011, eseguito su quasi 300 cani, fu attribuito alla funzione di *carrier* che possono avere i cani nei confronti di specie lipido-dipendenti tipiche della flora cutanea dell'uomo. Ciò è supportato dal fatto che successive colture eseguite sullo stesso soggetto risultarono positive solo a *M. pachydermatis* e non più a *M. furfur*.

I numerosi lavori presenti in letteratura hanno chiaramente stabilito come *Malassezia sp.* faccia parte della normale flora cutanea del cane e per questo è facilmente riscontrabile in numero variabile in varie regioni corporee.

Comparando i diversi riscontri presenti in letteratura emerge una notevole discordanza fra studi, in merito a quali siano le regioni corporee maggiormente popolate da *Malassezia*.

Yurayart (2011), ad esempio riscontrò la maggior frequenza di isolamento in corrispondenza della regione inguinale seguita dalla regione ventrale del collo, e condotto uditivo esterno.

Nel lavoro di Brito e colleghi del 2009, eseguito su più di 200 cani, le regioni in cui fu più facile mettere in evidenza la presenza di *M. pachydermatis*, a differenza del lavoro citato in precedenza, risultarono essere la regione perianale, seguita dalla mucosa vaginale, orale e prepuziale.

Altri lavori invece come quelli realizzati da Prado e colleghi nel 2008, Nardoni e colleghi nel 2007 e da Bond e colleghi nel 1995b evidenziarono come il canale auricolare e gli spazi interdigitali fossero sedi preferenziali dalle quali isolare tali lieviti.

Sulla base dei risultati qui presentati appare quindi chiara l'estrema divergenza nei risultati offerti dalla letteratura scientifica. La spiegazione di tali differenze può essere spiegata innanzitutto considerando l'effetto dei diversi metodi di campionamento utilizzati nel tempo. L'utilizzo di materiali differenti e la mancata standardizzazione della superficie oggetto del campionamento possono spiegare facilmente alcuni riscontri (Cafarchia et al., 2005a). Non si può inoltre escludere una differenza dovuta a stagione dell'anno e clima della regione in cui si sono svolti i lavori. Il tasso di isolamento, infatti, può variare in base ad umidità ambientale, stagione nonché secondo altri fattori in parte già citati come razza, età e patologie concomitanti (Kumar et al.; 2002; Machado et al., 2003; Duarte et al., 1999).

Tutti gli studi esaminati (Yurayart et al., 2011; Machado et al., 2011; Girao et al., 2006; Nardoni et al., 2004; Crespo et al., 2002; Kumar et al., 2002) non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nel numero di lieviti nei soggetti maschi rispetto alle femmine sia in gruppi di animali sani sia in gruppi di animali malati. Egualmente non emerge alcuna predisposizione in base all'età se si considerano i campionamenti dalla cute a differenza di quanto sembra accada nel condotto uditivo esterno. Girao, infatti, in uno studio del 2006 evidenziò una

predisposizione, a presentare positività alle colture per *Malassezia*, negli animali fra uno e tre anni di età.

Per quanto concerne predisposizioni di razza la letteratura appare discorde, mentre nell'ultimo lavoro pubblicato sull'argomento (Machado *et al.*, 2011) non è apparsa alcuna differenza statisticamente significativa, in numerosi altri studi del passato recente (Prado *et al.*, 2004; Cafarchia *et al.*, 2005a; Girao *et al.*, 2006) è emersa una predisposizione nelle seguenti razze: *basset hound*, bassotto tedesco, *cocker spaniel*, *West Highland white terrier*, e cane barbone.

In parte tale ritrovamento fu confermato da un lavoro di Brito e colleghi (2009) nel quale si notò una frequenza maggiore di isolamento di *Malassezia* nei *cocker spaniel* e nei cani barboni.

Già nello studio di Plant e colleghi del 1992 fu messo in evidenza come nel *basset hound* e nel bassotto tedesco vi sia mediamente un numero maggiore di *Malassezia* rispetto alle altre razze. Ciò fu confermato anche in studi successivi (Bensignor *et al.*, 2002; Bond *et al.*, 1997; Bond *et al.*, 1996).

Sia la frequenza d'isolamento sia la quantità di lieviti isolati risulta costantemente maggiore nei cani *basset hound*, in prelievi effettuati dalla cute come anche dalle mucose. In alcuni soggetti la proliferazione di tali lieviti può inoltre essere favorita da difetti primari della cheratinizzazione che comportano la presenza di eritema e seborrea.

I fattori che sembrano favorire la proliferazione di *Malassezia* includono quindi anomalie dello strato lipidico cutaneo, alta umidità ed alterazioni dell'immunità cellulo-mediata.

Infine, alcuni lavori (Mauldin *et al.*, 1997; Bond *et al.*, 1996, Mason e Stewart, 1993; Plant *et al.*, 1992) hanno ipotizzato, che come accade per altri lieviti del genere *Candida* ed anche nel genere *Malassezia*, nell'uomo (Hay, 1992; Klotz, 1989), vi sia un'influenza dei trattamenti farmacologici, antibiotici e corticosteroidi, sul

numero di lieviti riscontrabili sulla cute. Di fatto gli studi eseguiti non sono sufficienti a sostenere l'ipotesi iniziale (Scott *et al.*, 2001.)

In un recente lavoro (Machado *et al.*, 2011) eseguito su 297 cani fu messo a confronto un gruppo di soggetti sani con uno di cani presentanti segni clinici quali prurito, eritema, lichenificazione, seborrea escoriazioni ed alopecia, correlabili con una dermatite da *Malassezia*. Lo studio si concluse rilevando una probabilità statisticamente più elevata di ottenere colture positive di *Malassezia* nel gruppo di animali malati rispetto ai sani.

Nello stesso studio le lesioni furono valutate secondo il metodo CADESI -03 (Olivry *et al.*, 2007) e ciò permise di mettere in luce una relazione fra il punteggio di CADESI ed il numero medio di CFU per piastra.

Inoltre all'interno del gruppo dei malati gli animali positivi alla coltura per *Malassezia* presentarono un punteggio CADESI più elevato rispetto a quelli negativi alla coltura, mettendo in relazione la gravità delle lesioni con la presenza di *Malassezia* dimostrabile con il metodo colturale.

Una particolarità interessante di questo lavoro risiede nel fatto che il campionamento avvenne in cinque regioni predeterminate e quindi uguali nel gruppo dei sani e dei malati. Le aree non coincisero quindi automaticamente con zone interessate da lesioni.

I dati presentati in tale lavoro permisero agli Autori di stabilire come limite per considerare un animale affetto da dermatite da *Malassezia* quello di 120 UFC per piastra.

CARATTERI MORFOLOGICI

Malassezia pachydermatis è classicamente descritta come un lievito di forma variabile da ovoidale a forma di nocciolina americana. Le dimensioni approssimative sono all'incirca 2-3 μm di larghezza e 4-5 μm di lunghezza (Guillot e Bond, 1999; Akerstedt e Vollset, 1996).

Le altre specie differiscono lievemente per forma e dimensioni (Chen e Hill, 2005). Una caratteristica distintiva del genere *Malassezia* è la struttura della loro parete; dal punto di vista ultrastrutturale la parete cellulare è relativamente spessa (circa 0,25 μm) se paragonata con quella di altri lieviti, e si presenta multi stratificata (Mittag *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1991; Swift *et al.*, 1965).

Solamente la parete rappresenta circa il 26-37% dell'intero volume cellulare ed è inoltre circondata da un ulteriore strato lamellare la cui struttura è variabile e dipende dalla composizione lipidica del terreno di coltura (Mittag *et al.*, 1995).

Uno studio ultrastrutturale realizzato su *Pityrosporum orbiculare* evidenziò inoltre la presenza di organelli citoplasmatici quali un nucleo, vacuoli contenenti lipidi ed un numero variabile di mitocondri (Guillot e Bond, 1991; Swift *et al.*, 1965; Barfatani *et al.*, 1964).

RIPRODUZIONE

La proliferazione di *Malassezia* è interessante in quanto la sua sovraccrescita è responsabile di numerose patologie dermatologiche e sistemiche, nell'uomo e negli animali domestici.

I lieviti del genere *Malassezia* si riproducono per gemmazione unipolare o simpodiale (*Malassezia sympodialis*). Il processo di gemmazione è simile nelle varie specie, anche se il diametro della base è superiore in *M. pachydermatis* (0,9-1,1 μm) rispetto alle altre (0,5-0,7 μm).

Nel 1991 Nishimura descrisse accuratamente le fasi della gemmazione di *M. pachydermatis*.

Inizialmente il lievito in procinto di dividersi forma una struttura simile ad un uovo all'interno della sua parete; tale struttura si accresce verso l'esterno fino a formare una indentatura sulla parete del lievito. Quando la cellula figlia ha raggiunto le dimensioni della madre, l'indentatura si approfonda fino alla completa separazione (Chen e Hill, 2005).

Uno studio sulla variabilità genetica in *Malassezia pachydermatis* mise in luce come esista una notevole differenza fra ceppi differenti di *Malassezia* e collegò tale differenza con la possibilità che accanto alla riproduzione per gemmazione possa avvenire anche una forma di riproduzione sessuata (Midreuil *et al.*, 1999). Un altro lavoro (Xu *et al.*, 2007) evidenziò inoltre come alcuni geni caratteristici di organismi a riproduzione sessuata siano presenti anche nel genoma di alcune specie di *Malassezia*. Saranno comunque necessari ulteriori approfondimenti per confermare se tale forma di riproduzione sia effettivamente presente in una o in tutte le specie del genere *Malassezia*.

BIOCHIMICA

Notevole interesse suscita la sempre più frequente scoperta di produzioni enzimatiche da parte di specie di *Malassezia* lipido-dipendenti. Tale interesse è motivato dal fatto che gli enzimi prodotti sembrano essere coinvolti nella patogenesi delle manifestazioni cliniche dermatologiche.

Nell'uomo l'attività della lipossigenasi dei lieviti è ritenuta responsabile delle variazioni patologiche presenti nella *pityriasi versicolor* (De Luca *et al.*, 1996) e inoltre la presenza di lesioni è stata correlata positivamente con un incremento del livello dei lipoperossidi sulla superficie cutanea (Nazzaro-Porro *et al.*, 1986).

Tali metaboliti delle lipossigenasi sono ritenuti causa di danno ai melanociti e spiegherebbero la depigmentazione presente nella *pityriasis versicolor*.

Studi in vitro hanno inoltre dimostrato, ad opera di *Malassezia furfur*, la produzione di fosfolipasi, l'attività delle quali è provato causino liberazione di acido arachidonico da parte di cellule epiteliali umane, acido arachidonico responsabile dell'attivazione della cascata infiammatoria cutanea.

Per quanto riguarda *Malassezia pachydermatis*, sono numerosissimi gli studi effettuati in vitro che dimostrano come tali lieviti producano numerosissimi enzimi quali fosfatasi alcalina ed acida, condroitin solfatasi, esterasi, lipasi esterasi, galattosidasi, glucosidasi, ialuronidasi, leucina arilamidasi, lipasi, lecitinasi, perossidasi, fosfoamidasi, fosfolipasi, fosfoidrolasi, proteasi e ureasi.

In particolare è stato riscontrato come le lipasi siano prevalentemente associate alla membrana cellulare mentre le proteasi siano prevalentemente prodotti citoplasmatici (Chen e Hill, 2005).

In generale la produzione di enzimi da parte dei microrganismi è stata messa in relazione con la loro patogenicità. Per alcuni batteri, ad esempio, la produzione e la secrezione di esoenzimi sono state ritenute le maggiori responsabili della loro virulenza (Coutinho, 2005).

All'inizio degli anni Ottanta cominciarono a comparire lavori scientifici (Hanel *et al.*, 1988) che dimostrarono la produzione di fosfolipasi da parte dei funghi patogeni. Tali fosfolipasi sono in grado di danneggiare le membrane cellulari dell'ospite e quindi di causargli un danno (Edwards *et al.*, 1995; Barret-Bee *et al.*, 1985 e Price *et al.*, 1982).

Il termine fosfolipasi si riferisce ad un gruppo eterogeneo di enzimi che condividono l'abilità nell'idrolizzare uno o più legami estere all'interno dei glicofosfolipidi (Ghannoum, 2000).

La costituzione base delle membrane cellulari consiste in un doppio strato fosfolipidico intervallato da proteine. Si comprende quindi facilmente che

l'esposizione a fosfolipasi o a proteasi prodotte dai microorganismi determini la formazione di pori all'interno delle membrane, alterando le funzioni cellulari e favorendo l'invasione tissutale (Coutinho e Paula, 2000).

Per quanto riguarda *Malassezia sp.* alcuni studi sull'attività fosfolipasica furono eseguiti già negli anni Sessanta da ceppi di *M. furfur* isolati nell'uomo (Riciputo *et al.*, 1966) ma bisognerà aspettare l'ultimo decennio perché la letteratura scientifica s'interessa di specie di lieviti commensali di cane e gatto. In particolare Coutinho e i suoi colleghi (2000) si interessarono esclusivamente di *Malassezia pachydermatis* mentre Mancianti (2000) di *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. obtusa* e *M. slooffiae*.

Nello studio di Coutinho e Paula (2000) furono utilizzati trenta ceppi di *M. pachydermatis* provenienti da cani con otite o dermatite da *Malassezia* e si analizzò in particolare la produzione di quattro categorie di enzimi: proteinasi, fosfolipasi, ialuronidasi e condroitin-solfatasi. La produzione di fosfolipasi fu riscontrata in tutti i ceppi provenienti dalla cute ed in 14/15 ceppi provenienti dal canale auricolare. I due gruppi non mostrarono differenze significative nella quantità di enzimi prodotti. Fra le conclusioni del lavoro gli Autori inserirono anche l'ipotesi, seppur non dimostrata, che tale produzione enzimatica, potesse essere correlata, come per altri microorganismi alla patogenicità del lievito.

Anche Mancianti e colleghi (2000) dimostrarono un'elevata produzione enzimatica, differenziando quindici enzimi distinti. Purtroppo però, a causa dell'impostazione dei due lavori nulla si può concludere sulla relazione con la patogenicità dei vari ceppi testati.

A colmare la lacuna esistente si inserì uno studio di Cafarchia ed Otranto (2004) con lo scopo preciso di investigare l'attività fosfolipasica di differenti ceppi di *Malassezia pachydermatis* isolati cani sani e da cani con dermatite ed otite. Il lavoro coinvolse 646 ceppi isolati da varie regioni corporee (periorbitale, periorale, dorsale del naso, perianale, inguinale, interdigitale e canale auricolare esterno). Di

tutti 618 risultarono di *M. pachydermatis* e ventotto di *M. furfur*.

Gli isolati furono suddivisi in tre gruppi, prelevati:

- a) da aree coinvolte da lesioni cutanee (gruppo A);
- b) da aree di cute sana in pazienti con lesioni (gruppo B);
- c) da pazienti privi di lesioni in alcuna parte del corpo (gruppo C).

Tutti i cani con lesioni presentarono isolati con una produzione fosfolipasica rilevabile a differenza degli isolati del gruppo B e C. Solamente cinque dei cani inseriti nel gruppo C presentarono uno o più isolati secernenti fosfolipasi. In particolare fra i ceppi di *M. pachydermatis* de gruppo A il 93,9% produceva fosfolipasi a confronto con il 41,8% del gruppo B ed il 10,6% del gruppo C. Anche la quantità di enzimi prodotti risultò significativamente superiore nel gruppo A rispetto al gruppo B e C.

Sulla base dei risultati di questo studio si può quindi affermare che le fosfolipasi svolgono, anche in *Malassezia* un ruolo importante nella patogenesi delle lesioni indotte contribuendo alla virulenza del lievito stesso.

Risultato completamente opposto fu ottenuto in un lavoro di Coutinho nel 2005. L'autore considerò ceppi di lieviti provenienti dal condotto uditivo esterno di cani sani e con otite con lo scopo di evidenziare eventuali differenze di produzione enzimatica fra i due gruppi. Il lavoro fu basato su un campione di soli trenta animali e non giunse a dimostrare nessuna differenza statisticamente significativa fra i due gruppi. Ciò è sicuramente da tenere in considerazione e nuovi studi saranno necessari a chiarire le differenze riscontrate fra i due lavori qui presentati; tuttavia appare necessario sottolineare alcuni punti a sfavore del secondo lavoro. In primo luogo la numerosità limitata, secondo la mancata dimostrazione del ruolo primario svolto da *Malassezia* nei casi di otite esaminati. Questo punto appare, infatti, il più controverso. Coutinho stesso afferma di non aver provato se nei casi di otite esaminati, *Malassezia* rivestiva un ruolo primario o secondario. Ciò non permette quindi di trarre conclusione alcuna sulla mancata produzione di

fosfolipasi da parte di alcuni ceppi isolati nei pazienti con otite.

A conferma del lavoro di Cafarchia del 2004, la stessa Autrice nel 2008, con un altro gruppo di ricerca pubblicò un altro studio confermando i risultati precedenti. Il lavoro del 2008 cercò inoltre di comprendere se dal punto di vista genetico esistano delle differenze fra i ceppi isolati che possano spiegare la differente produzione fosfolipasica. Il lavoro non dimostrò differenze significative nella produzione fosfolipasica dei vari genotipi/subgenotipi determinati. Trovò però che alcuni genotipi sono più frequenti nelle sedi di lesione cutanea piuttosto che in altre regioni corporee o in animali sani. Data però la scarsa numerosità del campione esaminato, gli Autori non ritennero tali risultati sufficienti per trarre conclusioni definitive.

IMMUNOLOGIA

Introduzione

La cute è continuamente esposta ad una varietà molto ampia di stimoli provenienti dall'ambiente esterno. Molti di questi stimoli rappresentano potenziale fonte di danno all'organismo (Scott *et al.*, 2001).

La prima linea di difesa e protezione dell'organismo è rappresentata dall'epidermide, lo strato più superficiale della cute.

L'epidermide protegge il corpo dalla perdita d'acqua, dai danni da radiazioni ultraviolette, ingiurie meccaniche, invasione da parte di microorganismi patogeni ed insulti di natura immunologica (Chen e Hill, 2005).

La barriera meccanica è rappresentata dall'insieme dei cheratinociti, i quali con la loro adesione limitano i danni prodotti da parassiti e microorganismi e riducono la penetrazione di antigeni microbici ed allergeni (Ashbee ed Evans, 2002).

La cute tende a rispondere agli insulti ambientali attivando il sistema immunitario cutaneo ed aumentando il suo spessore. Il primo meccanismo comporta l'instaurarsi d'inflammation mentre il secondo, dovuto alla proliferazione dei cheratinociti, conduce ad iperplasia epidermica, ipercheratosi e lichenificazione (Chen e Hill, 2005).

In cani affetti da dermatite da *Malassezia* è comune riscontrare sia inflammation sia lichenificazione e ciò fa supporre che nella risposta a questo lievito siano reclutati entrambi i meccanismi difensivi sopra esposti.

Risposta immunitaria aspecifica

Numerosi aspetti contribuiscono alla difesa aspecifica della cute. In primo luogo la cute agisce da barriera meccanica. Fisiologicamente la cute resiste alla penetrazione di batteri e lieviti e in generale ciò non accade nei casi di rottura della barriera epidermica.

In secondo luogo la presenza di una flora microbica commensale, formata da stafilococchi e propionibatteri, attraverso la competizione per spazio e nutrienti limita lo sviluppo di eventuali patogeni.

Infine anche la desquamazione della cute svolge un ruolo protettivo, in quanto, soprattutto in condizioni d'inflammation, quando ne aumenta il tasso, favorisce l'eliminazione dei batteri dello strato più superficiale e limita la colonizzazione degli strati più profondi (Ashbee ed Evans, 2002).

Oltre ai fattori fin qui elencati, un altro ruolo aspecifico è svolto dalle cellule del sistema fagocitario. Nelle patologie cutanee caratterizzate da inflammation soprattutto se associate alla presenza di microorganismi sono secrete sostanze ad azione chemotattica per i neutrofili, comportando la loro migrazione nella sede

della lesione. Qui tali cellule, attraverso meccanismi di danno ossidativo o non ossidativo portano alla distruzione e rimozione dei microrganismi patogeni.

Nell'uomo, inoltre, è stato dimostrato l'effetto fungistatico esercitato da alcune sostanze lipidiche e proteiche presenti sulla superficie cutanea (Bibel *et al.*, 1993). Oltre alle funzioni immunitarie aspecifiche la cute è coinvolta anche in quelle specifiche, che a livello cutaneo come a livello sistemico, hanno delle componenti cellulari ed umorali.

Il sistema immunitario cutaneo, nella sua parte cellulare, è formato da numerose componenti fra le quali svolgono un ruolo attivo i cheratinociti, le cellule di Langerhans, i dendrociti dermici ed i mastociti come anche linfociti T e cellule endoteliali delle venule post capillari (Yager *et al.*, 1993). Le componenti umorali, invece, includono le proteine del complemento, le IgG ed IgA e numerose citochine (Ashbee ed Evans, 2002).

Le componenti cellulari

Difetti nella risposta immunitaria innata o acquisita possono comportare lo sviluppo di patologie cutanee.

Sulla base delle informazioni esistenti riguardanti altri microorganismi o altri antigeni si può formulare un'ipotesi che spieghi il meccanismo attraverso il quale *Malassezia pachydermatis* interagisce con il sistema immunitario nel cane.

Tale meccanismo prevede che gli enzimi prodotti da *Malassezia*, dopo aver penetrato la cute, siano catturati dalle cellule di Langerhans; queste cellule poi migreranno nei linfonodi e qui presenteranno l'antigene ai Linfociti T. Attraverso l'interazione con numerose citochine, si ha quindi lo stimolo differenziativo per i precursori dei linfociti T-*helper*. La prevalenza di IL12 indirizza la differenziazione verso Linfociti Th1 mentre la prevalenza di IL4 e IL13 favorisce la produzione di Th2. I linfociti Th sono in grado di attivare i linfociti B e stimolarli a differenziarsi

in plasmacellule, in grado di produrre anticorpi. Attraverso la secrezione di IL2 e IFN- γ , i Th1 promuovono la produzione di IgG, mentre IL4 ed IL13 prodotte dai Th2 promuovono la formazione di IgE. I due eventi non si escludono vicendevolmente e possono essere, con gradi variabili, contemporanei (Chen e Hill, 2005).

Nel 2010 uno studio di Valli e colleghi studiò la risposta di cellule mononucleari di sangue periferico canino all'esposizione a diversi antigeni fra cui quelli di *Malassezia pachydermatis*. Il risultato dell'esposizione consiste in una produzione prevalente di citochine di tipo Th1 come l'INF gamma. Tuttavia in una fase precoce di esposizione le prime citochine prodotte sono rappresentate da IL5 ed IL10 con una bassa produzione di TNF- alfa. A ventiquattro ore, invece, l'IL4 è l'interleuchina predominante con una produzione minoritaria di IL2 ed IL10. È interessante notare inoltre che la produzione di IL4 appare correlata all'età con un incremento produttivo dopo i quattro anni di età del paziente donatore.

La produzione di IgG specifiche nei confronti di *Malassezia pachydermatis* può, teoricamente, rappresentare un meccanismo parzialmente protettivo nei confronti dell'infezione da *Malassezia*.

Gli anticorpi, inoltre, attraverso l'attivazione della cascata del complemento porteranno alla comparsa d'infiammazione e danno epidermico.

La produzione di IgE specifiche, invece, può condurre alla sensibilizzazione dei mastociti; una successiva esposizione agli stessi allergeni comporterà il rilascio di numerosi mediatori responsabili dei segni clinici di una reazione d'ipersensibilità di tipo primo (Chen e Hill, 2005).

In questo momento solo alcune parti del meccanismo fin qui descritto sono state verificate nel cane, le altre, solamente nell'uomo.

Liberazione degli antigeni, penetrazione e presentazione

L'opinione comune è che l'ingresso attraverso la cute rappresenti il meccanismo con il quale *Malassezia sp.* stimola il sistema immunitario di pazienti con dermatite atopica (Scheynius *et al.*, 2002).

La possibilità di questi lieviti di penetrare integri attraverso la cute, dimostrata per *M. furfur* da (Baroni *et al.*, 2001) e la capacità di secernere antigeni, dimostrata *in vitro* per l'antigene *Mal s1*, supporta l'ipotesi che *Malassezia* penetri la barriera epidermica e probabilmente liberi degli allergeni nella cute. Qui il contatto fra gli organismi in toto assieme agli allergeni, con le cellule di Langerhans innesca il meccanismo in precedenza descritto.

Tali risultati suggeriscono che la sensibilizzazione, nei pazienti atopici, avvenga nella cute e sia mediata da cellule dendritiche immature in assenza di IgE.

Sempre nell'uomo è stata dimostrata la capacità di *M. furfur* di indurre, *in vitro*, la maturazione di MDDCs attraverso la diminuzione dell'espressione di CD83 ed incremento delle molecole CD80 e CD86 (Buentke *et al.*, 2001).

Le cellule dendritiche mature sono scarsamente efficienti nel legare gli antigeni ma eccellenti nel presentarli.

A tutt'oggi, la penetrazione e la presentazione degli antigeni di *Malassezia* nella cute del cane non sono state adeguatamente studiate. Tuttavia è stato dimostrato che l'applicazione di una sospensione di lieviti sulla cute in cani sani può indurre lesioni cutanee simili a quelle osservate nelle forme spontanee di dermatite da *Malassezia* (Bond *et al.*, 2004).

Ciò indica che gli antigeni di tali lieviti sono in grado di penetrare attraverso la cute e qui indurre l'effetto patogeno.

Esistono anche dati che dimostrano un maggior numero di cellule di Langerhans intralesionali in pazienti atopici rispetto ad aree non affette da lesioni, sempre in

animali atopici oppure rispetto ad animali sani (Day *et al.*, 1996 e Olivry *et al.*, 1996).

Olivry nel 1996 ha inoltre messo in luce l'espressione di IgE di superficie nelle cellule di Langerhans in campioni di cute con lesioni di pazienti canini atopici.

Negli stessi campioni, inoltre, inferiormente allo strato corneo, possono essere osservati granulociti eosinofili e tale riscontro non si ha in campioni da individui sani.

Considerando i dati fin qui esposti nella loro totalità, si può ipotizzare che *M. pachydermatis* possa rilasciare antigeni in grado di penetrare la cute nel cane, soprattutto in soggetti affetti da dermatite atopica. In tali pazienti, infatti, tali antigeni possono essere catturati dalle cellule presentanti l'antigene (APCs) e quindi innescare il processo di presentazione dell'antigene ai linfociti T e la cascata della risposta immunitaria.

Risposta immunitaria cellulo-mediata

L'immunità cellulo-mediata è fondamentale nella prevenzione e nella guarigione dalle infezioni fungine (Ashbee ed Evans, 2002; Mason, 1993).

L'alta incidenza, nell'uomo e negli animali, di dermatosi associate a *Malassezia sp.* in pazienti con immunodeficienze cellulari suggerisce che l'immunità cellulo-mediata sia importante nel mantenere tali microrganismi come allo stato di semplici commensali.

Nell'uomo, ad esempio, è segnalata una maggiore incidenza di dermatiti da *Malassezia sp.* in pazienti immunosoppressi per trapianti renali o di midollo osseo o che ricevono somministrazioni di steroidi (Segal *et al.*, 1989; Koranda *et al.*, 1974 e Boardman *et al.*, 1962) nonché affetti da AIDS (Smith *et al.*, 1994 e Vidal *et al.*, 1990).

Ciò comporta che un deficit nella risposta cellulo-mediata può porre le basi per una sovraccrescita di *Malassezia*.

La risposta cellulare nei confronti di *Malassezia sp.* è stata studiata sia nell'uomo sia nel cane.

Ashbee ed Evans del 2002 in un lavoro di riesame della letteratura clinica sull'immunologia delle patologie associate a *Malassezia sp.* misero in luce che *Malassezia sp.* può provocare una risposta cellulo-mediata significativa che però risulta simile in classi di età differente suggerendo che il livello dell'immunità cellulare rimane abbastanza costante durante la vita.

Nell'uomo la presenza di *Malassezia* presente sulla cute di individui sani senza storia di problemi dermatologici come commensale ed il riscontro di una risposta immunitaria umorale e cellulare misurabile fa sorgere alcuni dubbi nello studio di pazienti con dermatosi correlabili a *Malassezia*. Per dimostrare che effettivamente *Malassezia* è coinvolta nella patologia si dovrebbe dimostrare che la risposta immunitaria in pazienti malati è fundamentalmente differente da quella di animali sani. Purtroppo però gli studi eseguiti sulla popolazione sana hanno riscontrato una grande variabilità in base all'età dei pazienti testati e non esistono lavori nei pazienti malati che permettano di fare confronti per fasce di età.

In uno studio retrospettivo d'immunopatologia del 1997, eseguito in circa 110 animali, fu rilevato che, mediamente, il 60% delle cellule infiammatorie nell'epidermide e il 25 % nel derma è rappresentato da linfociti T. I linfociti B non sono rappresentati.

Nonostante ciò è risaputo che normalmente gli individui sani producono immunoglobuline specifiche nei confronti della flora commensale (Ashbee *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1992; Ingham *et al.*, 1987) e che è possibile riscontrare IgG, IgM, IgE, ed IgA secretorie nel sudore dell'uomo (Ishiguro *et al.*, 1981; Page e Remington, 1967).

Riscontri clinici, immunopatologici e istopatologici suggeriscono che la maggior parte dei fenomeni coinvolti nella patogenesi delle dermatiti da *Malassezia* nel cane siano inerenti a fenomeni d'ipersensibilità agli antigeni del lievito (Scott *et al.*, 2001). Dal punto di vista istopatologico, l'esocitosi dei linfociti e lo schieramento dei mastociti LL giunzione dermo-epidermica suggerisce l'esistenza di una reazione di ipersensibilità del IV tipo (ritardata) e del tipo I (immediata). Il riscontro di numerosi linfociti T CD3+ e plasma cellule potrebbe essere compatibile con tale tipo di reazione.

Le cellule di Langerhans sono cellule dendritiche derivate dal midollo osseo che formano una rete nell'epidermide e sono in grado di presentare l'antigene. La forma immatura di tali cellule esprime un livello basso del complesso maggiore d'istocompatibilità di classe II (MHCII) ed è in grado di presentare l'antigene ai linfociti T.

Sotto l'influenza del TNF e del fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagiche liberati dai cheratinociti, le cellule di Langerhans che hanno processato l'antigene maturano e migrano ai linfonodi regionali.

Qui diventano potenti immunostimolatori e promuovono lo sviluppo di linfociti T specifici.

Le cellule dell'endotelio vascolare cominciano ad esprimere la molecola di adesione intercellulare 1, a causa del rilascio di IL-1 and TNF da parte dei cheratinociti. I linfociti T sono quindi in grado di aderire alle cellule endoteliali e migrare fuori dalle vene, attraverso un processo di diapedesi, nel tessuto dermico. Qui i linfociti T secernono interferone gamma, che causa l'ulteriore espressione della molecola di adesione intercellulare da parte delle cellule endoteliali e incrementa l'espressione del MHC II da parte dei cheratinociti e delle cellule di Langerhans.

I macrofagi sono attratti a livello cutaneo e fungono da cellule presentanti l'antigene per i linfociti T comportando un'amplificazione della risposta.

La risposta cellulo-mediata è stata studiata sia nell'uomo sia nel cane utilizzando vari metodi.

Nell'uomo è dimostrato che cellule dendritiche immature derivate dai monociti preincubate con *M. furfur* inducono una risposta proliferativa in cellule mononucleari autologhe del sangue periferico (PBMCs) in maniera dose dipendente (Buentke *et al.*, 2001).

È molto probabile che tale evento rivesta un ruolo importante nella reazione infiammatoria dei pazienti atopici.

Numerosi studi effettuati nell'uomo (Tengvall Linder *et al.*, 2005; Savolainen *et al.*, 2001; Tengvall Linder *et al.*, 1996; Rokugo *et al.*, 1990) indagarono l'effetto sulle PBMCs. Anche per tali cellule fu osservata una risposta proliferativa indotta da alcune specie del genere *Malassezia* e tale risposta è significativamente superiore negli atopici rispetto ai sani.

Alcuni Autori negli anni (Johansson *et al.*, 2002; Terngvall Linder *et al.*, 2000; Rokugo *et al.*, 1990) hanno tentato di indagare la correlazione fra la proliferazione delle PBMC e la risposta ai test eseguiti in vivo sulla cute. Purtroppo i risultati sono spesso contrastanti e non permettono di affermare nulla di conclusivo.

Nel cane (Bond *et al.*, 1998) fu studiata la risposta cellulo- mediata nei confronti di *M. pachydermatis* in cani sani e con dermatite da *Malassezia*, utilizzando il metodo della proliferazione linfocitaria. In particolare la proliferazione di PBMCs osservata suggerisce che alcuni cani sani e alcuni affetti da dermatite siano in grado di sviluppare una risposta cellulo-mediata nei confronti di *Malassezia*. Lo studio coinvolse cani di razza *basset hound* sani e con dermatite seborroica, *beagle* sani e *setter* irlandesi con enteropatia da ipersensibilità al glutine. La risposta proliferativa di PBMC risultò significativamente inferiore nei *basset hound* malati e nei *setter* rispetto al gruppo dei *basset hound* sani. Non è ancora chiaro quale sia la rilevanza di tale fenomeno nella patogenesi dell'atopia.

In un altro lavoro del 2002 i cani atopici con evidenza citologica di sovraccrescita di *Malassezia* mostrarono una proliferazione cellulare di PBMC superiore rispetto ai controlli clinicamente sani mentre il gruppo degli atopici senza evidenza di sovraccrescita di lieviti reagì in maniera inferiore al primo gruppo ma superiore rispetto ai controlli sani (Morris *et al.*, 2002).

Come in studi presentati in precedenza, non si è potuto stabilire nulla in merito alla relazione esistente fra la proliferazione di PBMC in vitro e la risposta ai test intradermici in vivo.

L'anno seguente Nuttal e colleghi realizzarono un ulteriore lavoro evidenziando una risposta proliferativa di PBMC in seguito al contatto con estratti di *M. pachydermatis* sia in cani sani sia in cani atopici (2003) senza però mettere in evidenza differenze significative fra i gruppi come nel lavoro di Morris.

Risposta anticorpale a *Malassezia* (IgM, IgG, IgA)

Nell'uomo sono state individuate immunoglobuline specifiche contro proteine espresse in varie fasi di crescita di *Malassezia*; tali studi sono stati eseguiti su individui sani, non affetti da patologie dermatologiche o respiratorie.

Negli anni 80 alcuni studi (Cunningham *et al.*, 1985; Sohnle *et al.*, 1983) valutarono il livello d'immunoglobuline in pazienti divisi per classi di età.

Nessuno dei pazienti coinvolti aveva un'anamnesi di patologie dermatologiche correlabili ad una sovraccrescita di lieviti. In tutte le fasce di età furono riscontrate immunoglobuline di tutte le tre classi, specifiche per *Malassezia*. Inoltre il livello di IgG e di IgA risultò uguale nelle varie classi di età mentre il livello di IgM fu sensibilmente inferiore nei pazienti anziani rispetto ai giovani. Anche un altro lavoro (Bergbrant *et al.*, 1988) evidenziò una diminuzione dei livelli di IgG con l'avanzare dell'età ma rilevò una parallela diminuzione del numero di lieviti riscontrabili.

Nell'uomo sono stati condotti anche diversi studi per confrontare i livelli di IgG specifiche fra gruppi di pazienti con dermatite atopica e sani. I risultati sono spesso contrastanti.

Ad esempio in due lavori (Savolainen *et al.*, 2001; Tengvall Linder *et al.*, 2000) emerse una sostanziale uniformità nei livelli di IgG specifiche per *Malassezia* nei due gruppi analizzati attraverso esami sierologici. Un altro lavoro, invece, condotto da (Broberg *et al.*, 1992) in pazienti giovani, fra sedici e ventuno anni di età, affetti da dermatite atopica misurò un livello particolarmente elevato di IgG specifiche.

Un lavoro del 2000 (Tengvall Linder *et al.*, 2000) eseguito in pazienti umani mise però in dubbio il ruolo svolto dalle IgG nella patogenesi delle dermatiti correlate a *Malassezia*. Gli Autori, infatti, non riscontrarono alcuna correlazione fra il livello di IgG e la positività ai *Patch test* eseguiti in pazienti atopici.

Si può quindi ritenere, come affermato da diversi autori (Scheynius *et al.*, 2002; Tengvall Linder *et al.*, 2000) che la misurazione del livello di IgG non abbia alcun valore nello stabilire il grado di sensibilizzazione a *Malassezia* in pazienti atopici umani.

Nel cane uno dei primi lavori a studiare la risposta anticorpale e cellulo - mediata fu realizzato da Bond e i suoi colleghi nel 1998. Comparando cani sani a cani affetti da dermatite da *Malassezia* ed utilizzando metodiche ELISA, riscontrarono un livello sierico di IgG specifiche per *Malassezia* più elevato nei cani con dermatite da *Malassezia* rispetto ai cani sani. Per gli Autori, lo sviluppo di una forma di dermatite cronica in presenza di un elevato livello di IgG ed IgA specifiche porta a concludere che tali immunoglobuline siano del tutto inefficaci nel controllare la malattia stessa.

Molti anni più tardi, Bond (2002) riprenderà gli studi sull'argomento utilizzando una metodica *Western blotting* ed evidenziando che la risposta dei pazienti con dermatite da *Malassezia* è rivolta a proteine di peso molecolare differente rispetto ai pazienti sani. In particolare nella maggior parte dei pazienti fu evidenziata una

reattività nei confronti di epitopi di 132, 66, 50 e 54 kDa suggerendo che tale risposta non sia necessariamente associata con una dermatite da *Malassezia* in fase attiva. A differenza di ciò epitopi di 219, 110, 71 e 42 kDa determinarono reazione prevalentemente in cani con dermatite da *Malassezia*, suggerendo che la sensibilizzazione nei confronti di tali epitopi possa essere correlata con lo sviluppo della malattia.

Nel cane sono stati identificati elevati livelli sia di IgG sia di IgE in pazienti atopici (Nuttal *et al.*, 2001).

In particolare individui con dimostrata dermatite od otite da *Malassezia* mostrano livelli di IgG ed IgE più elevati sia dei pazienti sani sia dei pazienti atopici non affetti da patologie correlate a *M. pachydermatis* (Chen *et al.*, 2002).

Anche un altro lavoro del 2004 (Fraser *et al.*, 2004) riscontrò un titolo di IgG sieriche totali più elevato in cani atopici rispetto a cani sani.

I cani atopici hanno anche un elevato titolo sierico di IgE nei confronti di *M. pachydermatis* e mostrano spesso un'immunoreattività ad antigeni di 45, 52, 56, e 65 kDa (Chen *et al.*, 2002a), e cani con *M. pachydermatis* hanno una risposta anticorpale di tipo IgG nei confronti di un antigene di 25 kDa maggiore nei cani atopici rispetto ad un gruppo controllo sano (Chen *et al.*, 2002b).

In un recente lavoro del 2010 (Kim *et al.*, 2010) gli autori studiarono la risposta anticorpale di IgG nei confronti di *M. pachydermatis* in cani sani ed atopici.

Il lavoro rilevò una differenza statisticamente significativa fra il gruppo di atopici, con un livello di IgG più elevato, e quello dei cani sani. In particolare, la differenza risultò significativa per IgG specifiche nei confronti di proteine da 98 kDa ma rilevabile anche per proteine di 73, 74, 86 e 88 kDa, suggerendo che tali proteine siano rilevanti nella patogenesi delle manifestazioni cliniche di cani con dermatite atopica.

Alcuni studi precedenti (Chen *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2002b) avevano dimostrato che sia in cani sani sia in cani atopici sono rilevabili IgG specifiche nei confronti di

M. pachydermatis. Questi lavori, però, in parziale disaccordo con il lavoro di Kim e colleghi del 2010, avevano rilevato una reattività nei confronti di proteine di peso molecolare differente.

Gli Autori spiegano la differenza fra i vari studi esaminati con una differenza dell'espressione proteica osservata in fasi distinte della crescita del lievito (Habibah *et al.*, 2005); ad una differenza nella risposta individuale dell'ospite, variabilità di ceppo, e differenze nei processi estrattivi che influenzano il rilascio e la stabilità degli antigeni (Habibah *et al.*, 2005). A questo riguardo nell'ultimo lavoro citato è messo in evidenza come vi sia un'espressione antigenica variabile secondo la fase di crescita del lievito e come ciò influenzi di conseguenza la risposta anticorpale dei soggetti ospiti e possa poi determinare discrepanze nei risultati dei vari studi presenti in letteratura.

Lo studio di Kim e colleghi, inoltre, rilevò in accordo ad un lavoro precedente (Chen *et al.*, 2002b), che le IgG potrebbero agire da opsonine facilitanti la fagocitosi di antigeni di *Malassezia*. Questo meccanismo può avere una funzione protettiva ma può anche determinare l'attivazione della cascata del complemento ed in questo modo esacerbare lo stato infiammatorio.

Dall'elenco degli studi che hanno tentato di far chiarezza su quali siano gli antigeni più importanti di *M. pachydermatis* ed il ruolo delle immunoglobuline si può comprendere come la patogenesi delle patologie correlate a *Malassezia sp.* sia ancora in gran parte da scoprire.

Concludendo, quindi, è chiaro che sia in individui umani sani, sia in cani sani i lieviti commensali come *Malassezia sp.* sono in grado di indurre la formazione di IgG specifiche. Questo probabilmente riflette la semplice esposizione agli antigeni di tali lieviti. Tuttavia si può anche affermare che la risposta umorale risulta più pronunciata in cani con dermatite da *Malassezia* ed in uomini e cani con dermatite atopica. Il ruolo di tale risposta non risulta ancora chiaro nell'ambito della

patogenesi delle patologie dermatologiche ed ulteriori studi sono quindi necessari per far luce in tale ambito.

L'andamento cronico della dermatite da *Malassezia*, inoltre, suggerisce che gli anticorpi prodotti non svolgano un ruolo protettivo ma che più probabilmente siano implicati nello sviluppo della malattia stessa attraverso l'attivazione del sistema del complemento. (Sohnle *et al.*, 1983; Belew *et al.*, 1980)

Come considerazione finale si potrebbe inoltre riportare, come affermato da Chen e Hill nel 2005 che la risposta IgG potrebbe rappresentare solamente un epifenomeno che non influenza in alcun modo lo sviluppo della patologia.

Risposta IgE specifica

Nell'uomo IgE specifiche per *Malassezia* sono state determinate utilizzando molte metodiche differenti tra le quali ELISA, test radio allergometrici (RAST) e *Western blotting*.

Kröger e colleghi (1995) studiarono l'effetto di estratti di lievito sulla sintesi di IgE in vitro e sulla produzione di alcune citochine. Il lavoro fu eseguito in vitro utilizzando cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC). Tali cellule furono incubate con estratti antigenici a concentrazioni crescenti da 0,01 a 10 microgrammi per litro. Il livello di IgE risultò significativamente superiore in pazienti atopici con RAST positivo rispetto a pazienti atopici con RAST negativo. Inoltre nei pazienti con RAST positivo si osservò una produzione elevata di IL-4 ed IL-10.

Un altro dato interessante emerso da questo lavoro consiste in una correlazione positiva fra la produzione di citochine e la presenza di IgE specifiche contro *Malassezia*.

Un risultato simile che evidenzia un livello significativamente superiore di IgE in pazienti con dermatite atopica fu ottenuto in numerosi lavori scientifici utilizzando

sia metodiche con PBMC sia con tecniche RAST. La comparazione fu eseguita sia nei confronti di pazienti sani sia con gruppi di pazienti con forme di atopia non dermatologiche.

Tali risultati sembrano suggerire che la componente allergica rivesta un ruolo importante nella patogenesi della dermatite atopica e delle manifestazioni correlate alla dermatite da *Malassezia sp.*, nell'uomo (Savolainen *et al.*, 2001; Nordvall *et al.*, 1992; Wessels *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1989).

Nel 2000 Tengvall e i suoi colleghi riscontrarono una correlazione positiva fra il livello di IGE specifiche, e la risposta al test APT; tale correlazione non è invece rilevabile con il livello di IgE totali (Tengvall Linder, 2000).

Nel cane un lavoro del 2001 di Nuttall e colleghi, già citato in precedenza, confermò, similmente a ciò che accade nell'uomo, che i soggetti atopici hanno un livello di IgG ed IgE specifiche superiore rispetto ai pazienti sani. Inoltre fu possibile dimostrare che tale reattività non è correlabile al numero di lieviti a livello cutaneo.

Anche Chen e colleghi (2002b) avevano ottenuto risultati simili.

Nel 2005 un interessante lavoro di Farver e colleghi aggiunse delle nuove informazioni riguardanti questo aspetto controverso dell'immunologia delle patologie *Malassezia*-correlate. Il lavoro mostrò risultati parzialmente in contrasto con i precedenti.

Lo studio ebbe lo scopo di misurare in vivo la risposta a un allergene commerciale utilizzando la risposta al test intradermico (IDT) e la risposta IgE specifica determinata mediante metodo ELISA.

Entrambi i test dovrebbero essere in grado di illustrare la reazione umorale nei confronti degli allergeni ma i risultati evidenziarono la totale incapacità della misurazione delle IgE di discriminare fra i gruppi coinvolti nel lavoro (cani sani controllo, cani atopici con e senza dermatite da *Malassezia*, cani atopici con otite da *Malassezia*). La concentrazione di IgE si rivelò, infatti, molto simile nei vari gruppi.

Il test intradermico, invece, mostrò differenze statisticamente significative che saranno illustrate nel prossimo capitolo. La mancanza di correlazione fra i due test utilizzati indusse gli Autori a formulare diverse ipotesi esplicative che qui riassumiamo:

- 1) La concentrazione di IgE relativamente elevata riscontrata nei cani atopici senza evidenza di dermatite da *Malassezia* potrebbe essere giustificata da una precedente otite o dermatite da *Malassezia* non riportata in anamnesi;
- 2) similmente il livello alto/moderato di IgE documentato nei soggetti sani potrebbe corrispondere alla normale risposta del sistema immunitario nei confronti degli organismi commensali della cute (Lian *et al.*, 1998);
- 3) il risultato contrastante potrebbe essere anche giustificato dall'eterogeneità delle IgE nel cane. Sono state, infatti, documentate due tipologie di IgE, una delle quali è meno reattiva nei confronti degli anticorpi monoclonali anti IgE canine rispetto agli anticorpi policlonali (Peng *et al.*, 1997); è stato ipotizzato che l'anticorpo monoclonale utilizzato per lo studio non rilevi le stesse immunoglobuline specifiche responsabili della risposta in vivo al test intradermico;
- 4) infine anche la mancanza di specificità del test dovuta all'utilizzo di estratti allergenici non purificati potrebbe spiegare la mancanza di significatività dei risultati ottenuti.

Terminando, come avviene per la risposta delle IgG, sia pazienti umani sia canini, affetti da dermatite atopica, possono sviluppare una risposta umorale IgE mediata ad allergeni di *Malassezia* spp. e le IgE specifiche, prodotte nei confronti di *Malassezia*, quindi, sia nell'uomo sia negli animali, possono giocare un ruolo chiave nell'esacerbare la risposta immunitaria. Tutto ciò, però, soprattutto alla luce dei notevoli contrasti fra studi presenti in letteratura richiederà in futuro nuovi approfondimenti ed indagini.

Risposta mastocitaria

La risposta mastocitaria nei confronti di *Malassezia* è stata investigata nell'uomo utilizzando i test intradermici (IDT) oppure i *prick test* cutanei (SPT) in pazienti atopici. Uno studio (Young *et al.*, 1989) che comparò le due metodiche sopra esposte con estratti di *Malassezia* mostrò che i pazienti atopici reagiscono in percentuali maggiori all'intradermoreazione rispetto ai prick test. Alcuni studi che hanno utilizzato quest'ultima tecnica per determinare l'ipersensibilità a *Malassezia* sp. mostrarono un incremento della sensibilità in pazienti con forme di atopia generalizzata (Broberg *et al.*, 1992; Rokugo *et al.*, 1990) o in quelli con lesioni a localizzazione prevalentemente facciali e del collo (Nissen *et al.*, 1998; Kieffer *et al.*, 1990).

Sempre nell'uomo fu riscontrata anche una correlazione tra i risultati di SPT ed il livello di IgE specifiche per *Malassezia* (Kim *et al.*, 1999; Broberg *et al.*, 1992).

In cani atopici furono osservate reazioni d'ipersensibilità immediata all'iniezione intradermica di estratti di *M. pachydermatis* a concentrazioni che non determinano effetti in cani sani (Morris *et al.*, 1998).

Inoltre, sempre nello stesso studio, la reattività agli estratti di *Malassezia* in cani atopici con evidenza citologica di sovraccrescita del lievito stesso risultò significativamente superiore rispetto ai cani atopici del gruppo controllo.

Anche Bond e i suoi colleghi, nel 2002, indagarono tali aspetti dell'immunologia delle patologie correlate a *Malassezia* e misero in evidenza che la frequenza di positività all'IDT è superiore nei cani atopici rispetto ai controlli sani. Purtroppo tale lavoro non ha suddiviso ulteriormente i pazienti in base ai riscontri citologici e non è possibile concludere nulla su come ciò influenzi la risposta immunitaria.

In cani clinicamente sani, la somministrazione di un pool di sieri proveniente da cani atopici con dermatite da *Malassezia* e che mostrano positività all'IDT con estratti di *Malassezia*, permette di dimostrare nel sangue dei riceventi un livello

elevato di IgE specifiche per *Malassezia*. Inoltre tali riceventi mostrano una reazione positiva all'IDT eseguito con gli estratti di *Malassezia* giustificando l'ipotesi che le IgE trasferite con il siero siano funzionali e determinino una reazione da ipersensibilità del I tipo (Morris e De Boer, 2003).

I dati fin qui presentati suggeriscono che la risposta da ipersensibilità mediata dalle cellule mastocitarie sia coinvolta nella patogenesi e contribuisca ai segni clinici in alcuni casi di dermatite atopica canina (Chen e Hill, 2005).

Nel 2005 anche Farver e colleghi si interessarono dell'argomento e realizzarono uno studio per cercare di quantificare la risposta umorale di una reazione d'ipersensibilità del I tipo ad un estratto allergenico commerciale di *Malassezia pachydermatis* (Greer Lab).

Il lavoro rese evidente una differenza, molto significativa dal punto di vista statistico, fra il gruppo dei cani atopici senza dermatite da *Malassezia* sp. e quelli atopici con otite o dermatite da *Malassezia* sp.

Una reazione all'IDT si ebbe comunque anche nel 31% dei cani del secondo gruppo e ciò fu interpretato suggerendo le seguenti ipotesi:

- 1) il difetto di sensibilità della tecnica utilizzata per determinare la presenza dei lieviti;
- 2) la sensibilizzazione potrebbe essere avvenuta durante un precedente episodio di dermatite non riportato in anamnesi;
- 3) il numero di organismi che per convenzione rappresenta il limite oltre il quale si definisce la sovraccrescita di *Malassezia* potrebbe rappresentare un problema. Non si tiene conto, infatti, delle alterazioni della barriera epidermica che si riscontrano nei pazienti atopici. Tali alterazioni potrebbero favorire la sensibilizzazione anche con un numero di lieviti basso, inferiore alla soglia stabilita per la definizione di sovraccrescita.

Infine un altro tassello per comprendere meglio l'immunopatologia della dermatite da *Malassezia* fu aggiunto da Bond e colleghi nel 2006, i quali realizzarono due

studi utilizzando la tecnica del patch test per testare la risposta a *Malassezia pachydermatis* in cani sani, nel primo lavoro, ed in *basset hound* sani e con dermatite da *Malassezia* nel secondo lavoro (Bond *et al.*, 2006 a, b). Il patch test, utilizzato in medicina umana per la diagnosi delle ipersensibilità da contatto, prevede di mettere a contatto con la cute dei dischetti di nitrocellulosa impregnati di soluzione antigenica e di valutare a tempi prestabiliti la reazione, consistente in eritema, papule, placche etc. Il metodo fu scelto perché ritenuto, a differenza dell'IDT simile nell'esecuzione a ciò che dovrebbe avvenire nei pazienti in vivo che vengono a contatto naturalmente con il lievito studiato.

Nel primo lavoro, comprendente otto cani sani di razza *beagle*, furono eseguiti due patch test a distanza di otto giorni l'uno dall'altro. Il lavoro evidenziò come alcuni cani sani reagiscano positivamente alla prima esecuzione del patch test, altri solamente alla seconda, eseguita otto giorni più tardi. Il risultato del patch test fu messo a confronto, negli stessi pazienti, con il test intradermico ma non emerse alcuna correlazione significativa.

Nonostante sia difficile giudicare se la reazione osservata sia una reazione da ipersensibilità o una semplice infiammazione dovuta al contatto con una sostanza irritante la diversità nella risposta al primo e al secondo test suggerisce che potrebbe essere avvenuta una sensibilizzazione e che la reazione osservata nel secondo test sia attribuibile ad una forma di ipersensibilità.

Nel secondo lavoro pubblicato pochi mesi più tardi su *Medical Mycology* (Bond *et al.*, 2006b), gli Autori giunsero a una conclusione molto interessante. Dalla comparazione fra il gruppo dei cani affetti da dermatite con quelli sani, emerse una sostanziale differenza. I cani malati reagiscono più frequentemente al patch test rispetto ai cani sani e questo suggerisce che la risposta al patch test sia correlabile ad una ipersensibilità da contatto e non ad una semplice infiammazione da irritazione locale, la quale ci si potrebbe aspettare in percentuale uguale nei due gruppi canini. Inoltre, come nello studio precedente non vi è correlazione fra la

risposta al patch test e quella all'IDT ma il risultato di quest'ultimo test non mostra differenze significative fra il gruppo dei sani e dei malati.

Ulteriori studi, eseguiti in pazienti atopici di razze differenti da quelle finora esaminate, potranno in futuro far chiarezza sulla patogenesi di questa malattia.

Risposta epidermica alla dermatite da *Malassezia* spp.

Similmente ad altre patologie dermatologiche la dermatite da *Malassezia* è spesso associata ad iperplasia epidermica, un meccanismo difensivo osservato in generale nella cute in risposta a molti insulti di origine ambientale.

Il meccanismo attraverso il quale nelle dermatiti da *Malassezia* s'instaura l'iperplasia epidermica è ancora sconosciuto. Le spiegazioni più plausibili sono le seguenti:

- 1) Il lievito potrebbe produrre proteine in grado di agire come fattori di crescita e/o interagire con molecole di superficie dei cheratinociti;
- 2) Il ruolo del lievito potrebbe essere solamente secondario e l'iperplasia potrebbe essere legata alla patologia primaria che predispone alla dermatite da *Malassezia* o alla risposta immunitaria del soggetto determinata dal contatto con il lievito (von Tscherner *et al.*, 1999).

Dei rapporti intercorrenti tra *Malassezia* e i cheratinociti si conosce assai poco sia nell'uomo sia negli animali.

Uno studio (Chen *et al.*, 2002a) eseguito su cheratinociti canini tentò, senza successo, di verificare se estratti da colture di *Malassezia* siano in grado di stimolarne la proliferazione. Gli Autori conclusero tale lavoro affermando che l'iperplasia epidermica non sembra essere legata a sostanze prodotte dai lieviti oggetto dello studio ed ipotizzando quindi che tale iperplasia sia da attribuirsi ad un meccanismo non ancora chiarito.

In precedenza uno studio preliminare (Von Tschärner *et al.*, 1999) aveva messo in luce che la co-coltura di cheratinociti e *Malassezia* era in grado di determinare un aumento del tasso di proliferazione cellulare. La spiegazione di ciò è da mettere in relazione, probabilmente con il fatto che nello studio preliminare si usarono lieviti viventi e non solo gli estratti del loro metabolismo come nel lavoro di Chen e colleghi del 2002a. Il ruolo nello sviluppo dell'iperplasia epidermica è suggerito anche da report occasionali come quello di due *West Highland white terriers* con un'iperplasia epidermica e sovraccrescita di *Malassezia*, nei quali l'alterazione istopatologica si dimostrò reversibile in seguito a terapia antimicotica (Nett *et al.*, 2001).

Tali lavori non sono comunque conclusivi, poiché effettuati in vitro, e non permettono di escludere con sicurezza che i lieviti del genere *Malassezia* non svolgono un ruolo determinante nello sviluppo dell'iperplasia epidermica.

LA DERMATITE DA *Malassezia*

Caratteristiche cliniche

La dermatite da *Malassezia* è una patologia cutanea molto comune nel cane (Scott *et al.*, 2001). Fin dagli Anni '80 cominciarono ad apparire lavori scientifici al riguardo (Dufait, 1983).

Generalmente è considerata una patologia ad insorgenza secondaria e le malattie primarie che la favoriscono sono principalmente le malattie allergiche in particolare l'atopia, i difetti di cheratinizzazione e le malattie endocrine (Gross *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001; Nett *et al.*, 2001; Akerstedt e Vollset, 1996).

Tuttavia il ruolo di queste patologie sottostanti non è ancora ben compreso. Secondo uno studio di Bond e colleghi del 1996, infatti, la prevalenza dell'atopia,

dei difetti primari della cheratinizzazione e delle endocrinopatie nei cani con dermatite da *Malassezia* è uguale a quella della popolazione dermatologica in totale. Gli Autori, a tal proposito, suggerirono, che il riscontro di una dermatite da *Malassezia* fosse da considerarsi legato a una predisposizione individuale o di razza e che l'associazione con altre patologie dermatologiche fosse una mera casualità.

La patogenesi della dermatite da *Malassezia* rimane tuttora controversa. È stato ipotizzato che alterazioni nei meccanismi di difesa dell'ospite ed alterazioni del microclima cutaneo permettano a questi microrganismi di diventare patogeni opportunisti (Gross *et al.*, 2005).

L'eccessiva produzione di sebo, l'aumento dell'umidità cutanea, e l'interruzione delle normali funzioni di barriera della cute conducono alla proliferazione del lievito con conseguente infiammazione e prurito (Mason e Stewart, 1993) come illustrato nel capitolo sulla risposta dell'organismo nei confronti di *Malassezia sp.*

Inizialmente le lesioni più comuni sono eritema, desquamazione e croste cui si aggiungono nei casi in cui la malattia si cronicizza lichenificazione ed iperpigmentazione. A ciò si aggiunge che la maggior parte dei pazienti presenta un forte e sgradevole odore di rancido (Gross *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001).

I segni clinici sopra menzionati sono costantemente associati a prurito di grado variabile.

Alla sovraccrescita di *Malassezia*, nel 40% dei pazienti canini, è associata un'infezione da stafilococchi che altera ed aggrava il quadro clinico dermatologico (Guaguère e Prélaud, 1996).

Le lesioni della dermatite canina da *Malassezia* possono essere focali, multifocali o generalizzate. Le lesioni focali possono iniziare come macule ma evolvono spesso in placche nelle forme croniche. L'evoluzione della malattia porta sovente a lesioni coalescenti che coinvolgono numerose aree del corpo fino a forme generalizzate con la maggior parte della superficie cutanea interessata da lesioni.

La diagnosi clinica differenziale è complessa giacché la dermatite da *Malassezia* può mimare la maggior parte delle patologie infiammatorie cutanee croniche generalizzate (Gross *et al.*, 2005).

L'elenco differenziale comprende dermatite atopica, allergia al morso delle pulci, reazione avversa al cibo, reazione da farmaco, follicolite batterica superficiale, demodicosi, rogna sarcoptica, *acanthosis nigricans*, dermatite allergica da contatto, dermatite seborroica primaria e linfoma epiteliotropo (Scott *et al.*, 2001). A complicare la diagnosi deve inoltre essere tenuto in considerazione che la dermatite da *Malassezia* può essere secondaria a tutte le patologie sopra elencate e quindi presente concomitantemente.

I metodi più appropriati per la diagnosi di laboratorio saranno trattati nel successivo capitolo.

Diagnosi

Per la diagnosi della dermatite da *Malassezia*, in vari lavori scientifici, sono state proposte differenti tecniche fra le quali, la citologia della superficie cutanea, la coltura in vitro e l'esame istopatologico. Quale fra queste sia la più efficace, non è ancora stato stabilito con certezza (Machado *et al.*, 2011).

Nonostante l'elevata frequenza di questa patologia non esistono a tutt'oggi delle linee guida chiare per la diagnosi della dermatite da *Malassezia*. Nella maggior parte dei lavori scientifici presenti in letteratura la diagnosi è eseguita sulla base di segni clinici suggestivi e supportata dal riscontro di una proliferazione di lieviti, criteri estremamente imprecisi (Negre *et al.*, 2008).

Inoltre il riscontro di un numero di lieviti sopra una soglia predeterminata non tiene conto la possibilità che vi siano alcuni ceppi più virulenti di altri (Negre *et al.*, 2008) e che una particolare sensibilità dell'ospite possa determinare la

manifestazione di sintomi clinici anche in presenza di un numero basso di lieviti (Machado *et al.*, 2011).

Nella pratica clinica la citologia cutanea è a tutt'oggi la procedura diagnostica di prima scelta, anche se questo test è dotato di un'elevata specificità ma di una bassa sensibilità (Maynard *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2001). Il motivo del suo così ampio utilizzo risiede nella semplicità di esecuzione e nella rapidità di ottenimento dei risultati (Maynard *et al.*, 2011).

Dotato di ancor inferiore sensibilità è l'esame istopatologico, che presenta una percentuale molto elevata (30%) di falsi negativi (Gross *et al.*, 2005).

Al contrario, l'esame colturale è ritenuto il *Gold Standard*, in quanto è il test con maggiore sensibilità fra quelli citati. Solitamente è utilizzato nei lavori di ricerca e solo in casi particolari nella pratica clinica dermatologica (Machado *et al.*, 2011; Girao *et al.*, 2006; Cafarchia *et al.*, 2005a,b; Kennis *et al.*, 1996).

Le possibili metodiche per l'esame citologico sono numerose. Comprendono l'utilizzo di tamponcini di cotone strofinati sulla cute e poi fatti rotolare su un vetrino porta-oggetto, poi fissato e colorato; il prelievo attraverso pezzi di nastro adesivo applicati ripetutamente sulla cute e poi colorati con metodiche rapide come il *Dif-Quick*; lo scarificato cutaneo eseguito con lama da bisturi o con il bordo di un vetrino porta-oggetto, colorato con il blu di metilene; la citologia eseguita per impronta apponendo la superficie di un vetrino direttamente alla cute e successivamente colorato con metodiche rapide (Gross *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001; Guillot e Bond, 1999; Akerstedt e Vollset, 1996; Plant *et al.*, 1992).

Tutte le tecniche adottate, nonostante i tentativi, non possono che essere soggettive nella loro esecuzione. I risultati di differenti metodiche sono quindi molto difficili da confrontare (Negre *et al.*, 2008).

Nonostante non esista un numero specifico di malassezie universalmente accettato come soglia per stabilire quando si può parlare di sovraccrescita (Negre *et al.*, 2009), si può affermare che la presenza da due a dieci lieviti per campo ad alto

ingrandimento (x1000) è solitamente associata ad una sintomatologia clinica (Sai *et al.*, 2006), con variazioni relative alla razza (Bond e Lloyd, 1997).

In uno studio del 1996 di Kennis e colleghi che utilizzò varie metodiche di citologia a confronto, fu rilevato un numero medio di lieviti inferiore a otto per centimetro quadrato di superficie del campione. Un altro lavoro precedente (Plant *et al.*, 1992), invece, utilizzando la tecnica per apposizione di un vetrino rilevò che mediamente dalla cute di animali sani non si rileva più di una *Malassezia* per campo ad alto ingrandimento. Secondo altri studiosi si può considerare un paziente affetto da dermatite da *Malassezia* quando in un quadro clinico compatibile alla citologia si riscontrano più di dieci lieviti contandoli in quindici campi ad alto ingrandimento (HPF) scelti casualmente (Bond e Sant, 1993); un numero uguale o superiore a quattro lieviti per HPF (Guaguère e Prélaud, 1996); uno o più lieviti in dieci HPF (Carlotti *et al.*, 1996); due o più lieviti per campo a quattrocento ingrandimenti (Mauldin *et al.*, 1997).

Come per esecuzione della citologia anche il metodo colturale presenta numerose varianti.

La tecnica di campionamento, negli anni, ha previsto numerosi metodi, fra i quali la semplice impressione di un vetrino sulla regione anatomica da analizzare (Plant *et al.*, 1992), l'utilizzo di tamponi di cotone impregnati di soluzione salina sterile (Cafarchia *et al.*, 2008), scarificati cutanei (Dufait, 1983), il prelievo con strisce di nastro adesivo (Keneko *et al.*, 2007; Bond e Lloyd, 1995; Bond *et al.*, 1993), piastre da contatto ricoperte di terreno di coltura (Bond e Lloyd, 1995; Bond *et al.*, 1994) ed infine un metodo che prevede l'utilizzo di una soluzione detergente applicata su una regione delimitata di cute (Bond e Lloyd, 1995).

Negli studi più recenti il metodo più utilizzato è quello dei tamponcini di cotone inumiditi con soluzione sterile ed eventualmente additivati con Tween 80 (polioossietilen sorbitan monooleato) allo 0,1% (Yurayart *et al.*, 2011; Cafarchia *et al.*, 2008, Brito *et al.*, 2009; Nardoni *et al.*, 2007).

Per quanto concerne il metodo colturale, *Malassezia pachydermatis* è normalmente semplice da coltivare. Non essendo lipido-dipendente può crescere agevolmente sul Sabouraud destrosio agar ad una temperatura fra 32 e 37°C anche se alcuni ceppi richiedono senza supplementazione lipidica presentano una crescita stentata (Bond e Anthony, 1995). Poiché nella maggior parte degli studi in letteratura sono ricercate anche le specie lipido-dipendenti, il terreno maggiormente utilizzato risulta l'agar di Dixon modificato che permette la crescita anche delle specie lipido-dipendenti (Machado *et al.*, 2011, Cafarchia *et al.*, 2008; Nardoni *et al.*, 2004; Midgley *et al.*, 1998; Bond *et al.*, 1996; Bond *et al.*, 1994).

Un capitolo interessante riguarda inoltre la correlazione fra i risultati ottenuti mediante la citologia e quelli dell'esame colturale. Machado e colleghi (2011), ad esempio, dimostrarono una correlazione positiva fra i risultati dell'esame colturale e della citologia ottenuta attraverso la tecnica del nastro adesivo nei pazienti con numero elevato di lieviti (>2 lieviti per campo ad alto ingrandimento: x1000). Per quanto riguarda la correlazione negli altri gruppi questa risultò senza significatività statistica. Tale risultato è in accordo con quanto riportato da altri autori di studi precedenti (Cafarchia *et al.*, 2005a; Bensignor *et al.*, 2002; Kennis *et al.*, 1996; Plant *et al.*, 1992) che conclusero i loro lavori affermando che la citologia rimane un metodo molto utile per la diagnosi clinica routinaria ma che il metodo colturale rimane il Gold Standard per una valutazione quantitativa della popolazione di *Malassezia pachydermatis* sulla cute canina.

Come si può comprendere dalla numerosità degli studi presentati e dalla varietà dei risultati ottenuti non è possibile trarre conclusioni certe su quale sia la tecnica diagnostica migliore da adottare nella clinica dermatologica. Un ulteriore ausilio, ancora considerato valido, risiede nella valutazione della risposta alla terapia antimicotica (Scott *et al.*, 2001).

Istopatologia della dermatite da *Malassezia*

Moltissimo è stato scritto in merito ad aspetti clinici e terapeutici della dermatite da *Malassezia* al contrario degli aspetti istopatologici che sono stati studiati solo occasionalmente.

In letteratura si riscontrano due lavori (Mauldin *et al.*, 1997; Guaguère e Prélaud, 1996) che hanno indagato retrospettivamente le caratteristiche istopatologiche della dermatite da *Malassezia*.

Generalmente è accettato che la dermatite da *Malassezia* sia una dermatite interstiziale e perivascolare superficiale irregolarmente iperplastica e spongiotica nella quale sono predominanti un'ipercheratosi paracheratotica ed un'esocitosi linfocitica (Scott *et al.*, 2001; Mauldin *et al.*, 1997).

Possono essere presenti pustole neutrofiliche intraepidermiche (Scott *et al.*, 2001) e nel 15 % circa dei casi sono state osservate pustole eosinofiliche (Mauldin *et al.*, 1997; Guaguère e Prélaud, 1996).

Se osservabile, *Malassezia* non si trova distribuita uniformemente nello strato corneo. Solitamente è normale ritrovarla in accumuli focali, prevalentemente in corrispondenza degli osti follicolari (Gross *et al.*, 2005).

La presenza di lieviti a livello follicolare possiede una specificità diagnostica superiore per l'infezione clinica da *Malassezia* rispetto al semplice riscontro sulla superficie cutanea (Gross *et al.*, 2005).

Gli studi inizialmente citati indicano inoltre una percentuale di diagnostici falsi negativi di circa il 30% molto probabilmente dovuti anche alla processazione dei campioni per l'allestimento delle sezioni istologiche (Mauldin *et al.*, 1997; Guaguère e Prélaud, 1996).

La componente infiammatoria del derma è solitamente lieve o moderata ed è composta in misura variabile da linfociti, eosinofili, neutrofilo, talvolta mastociti ed in misura minore plasmacellule e macrofagi (Scott *et al.*, 2001). In alcuni casi

l'esocitosi linfocitica predomina sulle altre (Mauldin *et al.*, 1997).

Occasionalmente anche gli annessi cutanei possono essere interessati da un grado lieve di flogosi. Le ghiandole sebacee possono essere iperplastiche, anche se questo riscontro potrebbe essere secondario all'auto traumatismo dovuto al prurito (Gross *et al.*, 2005).

Purtroppo il quadro istologico spongiotico ed iperplastico non è per nulla specifico della dermatite da *Malassezia* e può essere osservato anche nelle dermatiti allergiche croniche del cane.

Tuttavia secondo Mauldin e colleghi (1997) osservare un'esocitosi linfocitica diffusa in un quadro di spongiosi e paracheratosi potrebbe essere molto suggestivo di dermatite da *Malassezia*, nel cane indipendentemente dall'osservazione diretta del lievito nel preparato istologico.

Certamente la diagnosi diventa più semplice se il quadro è associato ad un numero elevato di lieviti (Gross *et al.*, 2005).

Terapia

La letteratura scientifica riguardante le possibilità terapeutiche per la dermatite da *Malassezia* è abbastanza ampia; le terapie sono classicamente suddivise in sistemiche e topiche e prevedono prevalentemente l'utilizzo di derivati azolici o di disinfettanti (Negre *et al.*, 2008; Nuttall *et al.*, 2009).

Nella scelta della terapia ottimale è necessario sempre considerare la gravità della malattia nel soggetto che stiamo esaminando ed anche la fattibilità della terapia stessa. In quest'ultimo aspetto rientra sicuramente anche la collaborazione del proprietario, che nel caso di terapie topiche deve sempre essere tenuta in adeguata considerazione (Negre *et al.*, 2008).

Un recente lavoro di revisione scientifica di trentacinque studi pubblicati negli ultimi anni, realizzato da Negre e colleghi nel 2008, conclude che vi è una buona

evidenza per consigliare come trattamento topico l'utilizzo di uno shampoo a base di miconazolo (2%) e clorexidina (2%) due volte a settimana per tre settimane (Bond *et al.*, 1995a; Jasmin *et al.*, 2003).

Nonostante le conclusioni cui è giunta la revisione citata, nel Novembre del 2011 il "*Journal of Small Animal Practice*" pubblicò un lavoro di Maynard e colleghi per comparare uno shampoo a base di clorexidina al 3% con uno a base di miconazolo al 2% associato a clorexidina al 2%.

Si tratta di un lavoro prospettivo, randomizzato, controllato e in singolo cieco.

La differenza nel protocollo di applicazione dei due shampoo ha determinato l'impossibilità di realizzarlo in doppio cieco riducendone parzialmente il livello di evidenza scientifica.

I risultati dello studio mostrano una sostanziale uniformità nei risultati dei due shampoo testati. Anche l'andamento della riduzione dei lieviti è risultato sovrapponibile con i due prodotti testati.

L'ottimo risultato dello shampoo a base di clorexidina al 3% è in accordo con i risultati di precedenti lavori, eseguiti in vitro, nei quali la clorexidina si dimostrò in grado di uccidere tutti i lieviti dopo otto minuti di contatto con una soluzione 1:25 dello stesso shampoo (Lloyd and Lamport, 2000).

La clorexidina interagisce con i fosfolipidi della membrana cellulare, aumentandone la permeabilità e riducendo l'azione enzimatica dei microorganismi.

Con lo shampoo a base di sola clorexidina nel lavoro di Maynard e colleghi (2011) è riportato come possibile effetto collaterale una lieve desquamazione e prurito. Entrambi gli effetti, verificatisi in quattro cani furono transitori.

Se confermato, sarebbe il primo riscontro di effetti collaterali legati all'uso di clorexidina in shampoo nel cane.

Nei casi in cui non sia possibile la terapia topica, è raccomandabile l'utilizzo di ketoconazolo, da cinque a dieci mg/Kg una volta al giorno per tre settimane o

Itraconazolo alla dose di cinque mg/Kg una volta al giorno per due giorni consecutivi ogni settimana per tre settimane (Negre *et al.*, 2008; Nuttall *et al.*, 2009; Patel e Forsythe, 2008).

In uno studio del 2006 l'efficacia della terapia con ketoconazolo e quella della terapia pulsata con itraconazolo dimostrarono la stessa efficacia nel diminuire il numero di *Malassezia sp.*, ridurre il prurito ed i segni clinici della malattia (Bensignor, 2006).

La terapia pulsata è possibile grazie alla prolungata persistenza dell'itraconazolo nello strato corneo e offre indubbi vantaggi gestionali ed economici. Anche dal punto di vista dei possibili effetti collaterali, la terapia pulsata, ne riduce molto il rischio d'insorgenza. Dotato di minore tossicità rispetto al ketoconazolo (Mayer *et al.*, 2008), l'itraconazolo può comunque causare anoressia come segno di epatotossicità (Pinchbeck *et al.*, 2002).

Due lavori, uno del 2003 del gruppo di studio di Guillot ed uno del 2005 di Rosales e colleghi, valutarono la possibilità di utilizzare la terbinafina, farmaco antimicotico allilaminico, per la terapia della dermatite da *Malassezia*. Nel primo lavoro, eseguito in un gruppo di *basset hounds*, fu comparata l'efficacia della terbinafina a quella del ketoconazolo e i due farmaci si rivelarono in grado di ridurre la popolazione di lieviti in maniera del tutto sovrapponibile. Nel secondo lavoro invece la terbinafina fu messa a confronto sempre con il ketoconazolo, associato però a cefalessina per il trattamento di infezioni batteriche concomitanti. Anche in questo studio i risultati furono sovrapponibili.

Tuttavia secondo gli autori di un recente riesame della letteratura (Negre *et al.*, 2008) non esiste evidenza scientifica sufficiente per raccomandare l'utilizzo della terbinafina per via orale o di trattamenti topici a base di miconazolo, enilconazolo, clorexidina, piroctone olamina o benzalconio cloruro.

Un altro aspetto importante e non adeguatamente studiato riguarda la possibile resistenza di *M. pachydermatis* ad alcuni farmaci antimicotici.

Relativamente rari, infatti, sono gli studi di sensibilità agli antimicotici (Brito *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2007; Guillot *et al.*, 2003), i quali, soprattutto nel trattamento delle otiti esterne, si dimostrano talvolta inefficaci nella pratica clinica quotidiana. Brito e i suoi colleghi, ad esempio, sia nel 2007 sia nel 2009 in due studi su caratteristiche fenotipiche, distribuzione anatomica e resistenza agli antimicotici della popolazione di lieviti presente in cani sani rilevarono una sostanziale efficacia di tutti gli antimicotici azolici testati.

All'inizio del 2011 un gruppo di studio giapponese isolò per la prima volta nella letteratura scientifica un ceppo di *M. pachydermatis* resistente a ketoconazolo e itraconazolo (Nijima *et al.*, 2011).

Pochi mesi dopo il gruppo di studio di Cafarchia C. pubblicò un interessante lavoro (2011) sulla suscettibilità in vitro di ceppi di *M. pachydermatis* isolati da cani sani e con lesioni cutanee. I principi attivi presi in considerazione nel lavoro sono ketoconazolo, itraconazolo, miconazolo, fluconazolo, posaconazolo, voriconazolo, e terbinafina. Il confronto avvenne fra trenta ceppi isolati da cani sani e trentadue da soggetti con lesioni cutanee.

Secondo quanto emerge dal lavoro di Cafarchia e colleghi (2011) *Malassezia* sembra essere molto suscettibile ad itraconazolo, ketoconazolo e posaconazolo e meno sensibile a fluconazolo e miconazolo. Le osservazioni sono in sostanziale accordo con quanto riscontrato in studi precedenti (Nijima *et al.*, 2011; Jesus *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2008; Rincon *et al.*, 2006; Sugita *et al.*, 2005; Eichenberg *et al.*, 2003; Garau *et al.*, 2003; Nascente *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2000).

Per terbinafina, posaconazolo e miconazolo è difficile eseguire confronti con la letteratura poiché la numerosità dei ceppi testati nei lavori precedenti è molto bassa ed i valori di MIC considerati non sono sempre gli stessi.

Lo stesso lavoro mette in luce un dato interessante; i valori di MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) degli isolati da cani con lesioni risultarono mediamente più elevati di quelli degli animali sani a supporto dell'idea che la precedente

esposizione dei lieviti dei cani malati ad antimicotici utilizzati per la terapia ne abbia ridotto la suscettibilità inducendo una parziale resistenza (Jesus *et al.*, 2011; Velegraki *et al.*, 2004). In questo studio si riscontrarono numerosi ceppi resistenti agli antimicotici e, in particolare, gli Autori rilevarono che i lieviti che presentavano resistenza al fluconazolo erano resistenti anche agli altri azoli. Questo risultato permette di ipotizzare un fenomeno di resistenza crociata come descritto per altri lieviti come ad esempio *Candida glabrata* (Vermitsky e Edlind, 2004).

Le evidenze riportate finora consentono quindi di sottolineare l'importanza di effettuare una terapia adeguata per scelta dell'antimicotico più efficace, dose e durata del trattamento. Nonostante non siano ancora riportati in letteratura casi di resistenza dimostrati in vivo in pazienti affetti da dermatite o otite da *Malassezia* non bisogna trascurare la possibilità, in caso di mancato successo terapeutico, che ci si trovi di fronte ad un ceppo resistente al farmaco utilizzato.

POTENZIALE ZOONOTICO

Nell'uomo *Malassezia sp.* forma parte della normale flora cutanea commensale ed è implicata in patologie quali la *pityriasis versicolor*, la follicolite da *Malassezia* e la dermatite seborroica (Ashbee, 2007).

In pazienti immunodepressi può inoltre essere associata a gravi patologie cutanee e sistemiche incluse fungemia e sepsi (Tragiannidis *et al.*, 2010).

La follicolite da *Malassezia* si può osservare soprattutto in pazienti con sottostanti patologie sistemiche con componenti immunodepressive quali diabete mellito, neoplasie, AIDS e nei pazienti immunosoppressi farmacologicamente in seguito a trapianto d'organo o di midollo osseo (Rhie *et al.*, 2000; Fearfield *et al.*, 1999, Archer-Dubon, 1999; Ashbee *et al.*, 1993; Helm *et al.*, 1993; Yohn *et al.*, 1985).

La dermatite seborroica è una patologia cutanea ricorrente caratterizzata da

desquamazione, che colpisce il 2-5% della popolazione sana. La sua incidenza è però notevolmente superiore nei pazienti con AIDS, nei quali si ritrova in percentuali fra il 30 e l'80% secondo gli studi presi in considerazione (Ashbee *et al.*, 2007).

Inoltre, i lieviti del genere *Malassezia* possono causare infezioni potenzialmente fatali in pazienti umani immunocompromessi o in neonati, soprattutto se nati precocemente (Morrison *et al.*, 2000; Archer Dubon, 1999; van Belkum *et al.*, 1994; Marcon e Powell, 1992; Gueho *et al.*, 1987).

Le informazioni disponibili in letteratura sulla fungemia e le patologie sistemiche da *Malassezia sp.* sono piuttosto limitate (Tragiannidis *et al.*, 2010). Le due specie maggiormente coinvolte sembrano essere *M. furfur* e *M. pachydermatis*. In particolare la seconda è stata implicata in episodi di infezioni nosocomiali e neonatali (Chryssanthou *et al.*, 2001; Dankner *et al.*, 1987).

Il primo caso documentato in letteratura risale al 1981 quando Redline e colleghi riportarono il caso di un neonato colpito da infezione polmonare da *Malassezia sp.* probabilmente collegato all'utilizzo della nutrizione parenterale totale (Redline *et al.*, 1981). In assoluto, infatti, il rischio maggiore rimane quello legato al posizionamento di cateteri intravenosi ed alla nutrizione parenterale con lipidi (Marconi *et al.*, 1992) soprattutto se sono presenti componenti immunodepressive per gravi patologie o per insufficiente sviluppo del sistema immunitario come nei nati prematuri.

Successivamente i casi riportati si fanno sporadici, per aumentare di numero negli ultimi due decenni (Tragiannidis *et al.*, 2010; Chryssantou *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 1998; Welbel *et al.*, 1994; Surmont *et al.*, 1989).

I fattori di rischio per infezioni da *Malassezia sp.* sono la prematurità dei nati, il posizionamento di un catetere venoso centrale, l'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro e la nutrizione parenterale totale per lunghi periodi con soluzioni lipidiche (Welbel *et al.*, 1994; Marcon *et al.*, 1987).

Ad esempio nel 2006 Giusiano ed i suoi colleghi eseguendo colture da cateteri venosi e da sangue di pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva in Argentina rilevarono come i più frequenti contaminanti, fra i lieviti appartenessero al genere *Candida*, anche se furono rilevati anche casi di presenza di *Malassezia furfur* e *M. sympodialis*. Anche in altri lavori esaminati (Oliveri *et al.*, 2011; Curvale-Fauchet *et al.*, 2004) queste ultime due specie sono molto frequenti.

Anche per *M. pachydermatis* però non sono infrequenti le segnalazioni e già nel 1987 all'Istituto Pasteur, Gueho ed i suoi colleghi isolarono tale lievito in pazienti umani da liquidi corporei provenienti da occhi e vagina, nonché da campioni di sangue.

Le segnalazioni di fungemia riguardano, quindi, non solo le specie commensali dell'uomo, quale ad esempio *M. furfur* ma anche *M. pachydermatis* (Chang *et al.*, 1998) e in questo secondo caso è chiamato in causa il ruolo di portatore che possono svolgere gli operatori sanitari proprietari di cani.

Ciò è perfettamente illustrato da un lavoro eseguito su un episodio di epidemia da *Malassezia pachydermatis* osservato in un'unità intensiva pediatrica. Le conclusioni del lavoro suggeriscono che l'infezione fosse stata introdotta da operatori sanitari proprietari di cani e da loro trasmessa ad un paziente, mezzo di trasmissione verso altri operatori sanitari e quindi verso altri pazienti.

In un altro lavoro si riscontrò inoltre l'estrema resistenza di *M. pachydermatis* sulle superfici delle culle incubatrici con ciò rappresentando una continua fonte lieviti per la reinfezione (Van Belkum *et al.*, 1994).

Della morbilità e mortalità delle infezioni da *Malassezia sp.*, purtroppo, si conosce ben poco, anche se sembra che un'appropriata gestione farmacologica eviti, nella maggior parte dei casi, la morte del paziente (Richet *et al.*, 1989).

Il ruolo di portatore fu indagato anche in un lavoro del 2005 di Morris e colleghi. Lo studio esaminò 75 proprietari di cani affetti da otite o dermatite da *Malassezia* mettendoli a controllo con un gruppo di 50 proprietari di cani sani. Per la ricerca

dei lieviti fu adottata sia la tecnica colturale sia quella d'identificazione molecolare. Attraverso la coltura di tamponi, prelevati dalla cute delle mani dei proprietari dei cani, emerse una differenza statisticamente significativa nel tasso di isolamento di *Malassezia pachydermatis* fra il gruppo dei proprietari di cani malati rispetto a quello dei sani. Le tecniche d'indagine molecolare mostrarono una sostanziale sovrapposibilità nei dati dei due gruppi. Essendo tali tecniche dotate di sensibilità molto più elevata rispetto alle colture è evidente come il tasso di positività sia molto elevato in tutti i proprietari di animali, indipendentemente dallo stato di salute o malattia per il ruolo di commensale svolto da *Malassezia*. Gli Autori conclusero il lavoro sottolineando la fondamentale importanza delle buone pratiche igieniche.

OBIETTIVI

Negli ultimi anni le specie del genere *Malassezia* hanno riscosso, nella letteratura scientifica, notevole successo, diventando oggetto di numerosissimi studi, che hanno cercato di chiarirne caratteristiche biologiche e ruolo patogeno.

Nonostante ciò rimangono ancora molti interrogativi riguardanti il rapporto ospite-commensale.

Questo studio ha avuto come obiettivo l'approfondimento della conoscenza di alcuni aspetti clinici ed eziopatogenetici della dermatite ed otite da *Malassezia sp.* nel cane ed in particolare:

1. Mettere in luce fattori predisponenti quali caratteristiche dell'ospite (Es. razza, genere ed età) o fattori esogeni (Es. trattamenti farmacologici) che possono influenzare l'insorgenza e lo sviluppo della malattia;
2. rilevare aspetti clinici e sintomatologici caratteristici della patologia in esame;
3. quantificare e localizzare la popolazione di *Malassezia sp.* a livello della cute di soggetti sani e affetti da malattie dermatologiche, in regioni standard ed affette da lesioni;
4. confrontare i risultati di due metodi diagnostici differenti, l'esame citologico e l'esame colturale che in letteratura hanno dimostrato possedere sensibilità e specificità molto differenti;
5. indagare la presenza di specie lipido-dipendenti del genere *Malassezia* e la diffusione di altri generi di funghi a livello della cute del cane.

MATERIALI E METODI

ANIMALI

I soggetti coinvolti nello studio sono stati reclutati fra quelli giunti all'Unità operativa di Dermatologia (UOD) del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie (DSCV) della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova nel triennio 2008-2010.

Sono stati inclusi nel lavoro tutti i soggetti di specie *Canis familiaris* che presentassero in base a riscontri citologici sovraccrescita di lieviti attribuibili al genere *Malassezia*, a livello cutaneo e/o auricolare ed un gruppo di cani dermatologicamente sani giunti al DSCV per procedure diagnostiche o chirurgiche elettive, quale gruppo di controllo.

Tutti i soggetti sono stati identificati con un numero univoco progressivo (Id).

Il gruppo degli animali malati è stato identificato come "gruppo A" ed il gruppo dei sani come "gruppo B".

Ciascun cane è stato sottoposto a esame obiettivo generale (E.O.G) e a visita dermatologica secondo lo schema riportato di seguito.

La visita è stata completata, secondo le necessità, da raschiati cutanei superficiali e profondi ed esami citologici ottenuti per apposizione diretta del vetrino o di nastro adesivo trasparente in corrispondenza delle lesioni, striscio da tampone ed eventualmente, esami colturali micologici e batteriologici. In base al problema riscontrato, si è seguito l'iter diagnostico più appropriato per raggiungere, quando possibile, una diagnosi definitiva. Ad esempio, per la diagnosi di dermatite atopica (DA) si è iniziato con l'eliminazione di tutti gli ectoparassiti, e si è proceduto, attraverso una dieta di eliminazione e successiva provocazione, all'esclusione delle reazioni avverse al cibo (RAC), secondo protocolli pubblicati (*Favrot et al., 2010, DeBoer e Hillier, 2001*); per le endocrinopatie con componenti immunodepressive sono stati eseguiti test ormonali nei casi in cui gli esami ematobiochimici di base lo hanno suggerito.

La gravità delle lesioni è stata valutata tramite CADESI-03, *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index* (Olivry *et al.*, 2007).

I dati relativi al paziente, alla visita clinica ed alle indagini eseguite sono stati registrati su apposite cartelle cliniche come riportato in Fig. 1.

Università degli Studi di Padova
Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro -Agripolis

Esame Dermatologico

Dott.:	
Data:	
Numero Cartella:	
Veterinario Referente:	

PAZIENTE: _____

SPECIE: _____ RAZZA: _____ ETA': _____

PROPRIETARIO: _____ SESSO: _____

INDIRIZZO: _____ TEL: _____

VETERINARIO: _____

Peso Provenienza

Motivo della Visita

Precedenti problemi dermatologici

Problemi attuali

Habitat

Viaggi

Altri animali

Famiglia

Alimentazione

Controllo ectoparassiti

Bagni

Altri problemi - terapie in atto

Esame Obiettivo o Generale

Visita dermatologica

Problemi	Diagnosi differenziali	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Esami di laboratorio

Raschiati

Tricogramma

Lampada di Wood Es. Micologico

Scotch Test

Citologia

Test Endocrini

Esami emato-biochimici

TERAPIA TOPICA

TERAPIA T SISTEMICA

PIANIFICAZIONE

Fig. 1 Fac-simile della cartella clinica utilizzata per la visita dermatologica

CAMPIONAMENTO

In tutti gli animali oggetto dello studio sono stati eseguiti i campionamenti come segue:

1. Esame citologico eseguito tramite apposizione di nastro adesivo trasparente dalle regioni ascellare sinistra, interdigitale dell'estremità anteriore sinistra e del padiglione auricolare sinistro nella sua faccia interna. Tali regioni anatomiche sono state identificate con una lettera minuscola progressiva:

a (ascella),

b (regione interdigitale),

c (padiglione auricolare).

Oltre a queste regioni *standard* sono state campionate con la stessa metodica tutte le regioni con lesioni cutanee significative (indicate con le lettere minuscole successive d, e,...) ed è stata eseguita la citologia del cerume auricolare utilizzando, per il prelievo, un tampone di cotone, fatto rotolare sulla superficie di un vetrino porta-oggetto;

2. Prelievo della flora cutanea tramite l'utilizzo di un tampone di cotone imbevuto di soluzione salina, il tutto sterile, dalle regioni standard (a, b, c) nonché dalle sedi di lesione ove all'esame citologico si riscontrasse una sovraccrescita di lieviti attribuibili al genere *Malassezia* come nella letteratura più recente (Yurayart *et al.*, 2011, Brito *et al.*, 2009, Cafarchia *et al.*, 2008). I campioni sono stati consegnati al Laboratorio di Micologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) entro ventiquattro ore dal prelievo e successivamente conservati a +4°C fino al momento della semina.

ESAME CITOLOGICO

I campioni prelevati con la metodica in precedenza descritta sono stati sottoposti a colorazione mediante l'utilizzo di un kit commerciale per la colorazione, Diff-Quick®. Per campioni su nastro adesivo il passaggio della fissazione a base alcolica non è stato eseguito.

I campioni provenienti dal condotto uditivo esterno, inoltre, prima di essere inseriti nelle tre soluzioni consecutive della metodica Diff-Quick® sono stati fissati a caldo passando, per pochi secondi, sotto il vetrino porta-oggetto, una fiamma.

Si sono osservati per ogni preparato, corrispondente a una regione corporea standard o alla sede di una lesione, cinque campi ad elevato ingrandimento (400X) ed in ognuno di questi campi è stata eseguita una stima del numero di lieviti ascrivibili al genere *Malassezia*, secondo l'esempio qui di seguito riportato.

Paziente (ID)	Regione anatomica	<i>Malassezia</i> sp (semiquantitativa)					
		0	A	B	C	D	E
1	Ascella		x x	x	x		x

Legenda numero *Malassezia* sp.

A: 1-5
B: 6-10
C: 11-50
D: 51-100
E: >100

Sono stati considerati in numero superiore alla flora normale e quindi indice di una sovraccrescita un numero pari o superiore a due lieviti per campo microscopico a 400x per la cute e dieci lieviti per campo a 400X nel caso del prelievo eseguito dal condotto uditivo esterno.

ESAME COLTURALE

I tamponi sono stati seminati in piastre di Sabouraud destrose agar e Dixon agar per la ricerca di lieviti, su terreno selettivo Mycobiotic agar per la ricerca di dermatofiti ed incubate rispettivamente a 32 e 25°C per almeno quindici giorni con monitoraggio giornaliero della crescita delle colonie. Le colonie sono state classificate a livello di genere mediante micro e macromorfologia, e attraverso tecniche di biologia molecolare a livello di specie.

DIAGNOSI MEDIANTE METODICA DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Il DNA è stato estratto da colonie di *Malassezia* cresciute in coltura su Dixon agar mediante il kit commerciale QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN® GmbH, Hilden, Germania). E' stata successivamente amplificata una porzione ITS del genoma mediante i primers universali ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). I prodotti di amplificazione, separati mediante corsa elettroforetica su gel di acrilamide al 7% e visualizzati mediante colorazione con nitrato d'argento, sono stati successivamente sequenziati mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA-USA).

ANALISI DEI DATI

I dati raccolti nel presente studio sono stati sottoposti ad analisi statistiche di tipo descrittivo calcolando percentuali e medie attraverso l'utilizzo di Microsoft® Excel® Versione 14.0.0.

I sequenziamenti delle regioni ITS sono stati analizzati mediante il software Applied Biosystems SeqScape Software® v2.5 (Applied Biosystem Foster City, CA-USA) e le sequenze ottenute sono state poi confrontate con quelle presenti nel database CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures (<http://www.cbs.knaw.nl/>) per ottenere l'identificazione e/o la conferma di specie.

RISULTATI

Nel periodo da Maggio 2008 a Dicembre 2010 sono giunti UOD 240 nuovi pazienti fra i quali sono stati selezionati 84 cani rispondenti ai requisiti d'inclusione dello studio (gruppo A).

Sono stati inoltre inclusi 13 cani sani, senza lesioni cutanee o problemi dermatologici in anamnesi recente e remota. Tali soggetti costituiscono il gruppo B. In totale sono stati quindi considerati 97 cani.

Nelle Tabelle n. 1 e 2 sono riportati i dati essenziali del segnalamento (razza, sesso ed età) dei soggetti del gruppo A e B.

Gruppo A							
Id	Razza	Sesso	Età (mesi)	Id	Razza	Sesso	Età (mesi)
1	Shih-tzu	F	120	38	Carlino	F	66
2	Pastore tedesco	F	24	39	Meticcio	F	72
9	Meticcio	F	60	40	Setter irlandese	M	84
10	Alano tedesco	F	38	41	Basset hound	F	73
15	Shih-tzu	M	144	42	Setter inglese	M	48
16	Maltese	M	71	43	Labrador	F	29
20	Meticcio	F	68	44	Shih-tzu	F	107
21	Meticcio	M	4	45	Meticcio	M	192
22	Bulldog inglese	M	60	46	Meticcio	F	62
23	Pastore tedesco	F	144	47	Meticcio	M	56
24	Pastore tedesco	M	82	48	Pastore tedesco	M	139
25	Meticcio	F	67	49	Setter inglese	F	12
26	American staffordshire terrier	F	9	50	Boxer	F	24
27	Basset hound	F	96	51	Labrador	M	23
28	Golden retriever	M	99	52	Pastore tedesco	F	120
29	Carlino	F	82	53	Jack russel terrier	M	7
30	Bassotto tedesco	F	42	54	Meticcio	F	49
31	Meticcio	M	101	55	Boxer	F	66
32	San Bernardo	M	82	56	Epagneul breton	F	42
33	Cocker spaniel	M	105	57	Cavalier King Charles spaniel	M	65
34	Basset hound	F	72	58	Boxer	M	35
35	Shih-tzu	F	123	59	Bouledogue francese	M	22
36	Labrador	F	18	60	Bassotto tedesco	F	63
37	Meticcio	M	25	61	Pastore tedesco	M	70

Tabella n. 1 Razza, sesso ed età dei pazienti del gruppo A

Gruppo A							
Id	Razza	Sesso	Età (mesi)	Id	Razza	Sesso	Età (mesi)
62	Golden retriever	M	27	80	Pastore tedesco	M	112
63	Bassotto tedesco	F	17	81	Segugio	F	93
64	Carlino	F	80	82	Pastore tedesco	F	120
65	Yorkshire terrier	F	59	83	Maltese	F	25
66	Meticcio	F	20	84	American staffordshire terrier	F	7
67	Volpino di Pomerania	M	51	85	Corso	M	69
68	Boxer	M	18	86	Labrador	F	103
69	Meticcio	M	42	87	Golden retriever	F	53
70	Boxer	M	54	88	Golden retriever	M	66
71	Pastore tedesco	F	51	89	Dogo argentino	F	7
72	Pinscher	F	35	90	Bulldog inglese	F	25
73	Labrador	F	32	91	Alano tedesco	F	20
74	West Highland white terrier	F	51	92	Akita inu	F	145
75	Labrador	F	26	93	Pastore tedesco	F	80
76	Dobermann	F	8	94	Drahtaar	F	55
77	Golden retriever	M	43	95	Cocker spaniel	M	93
78	Cavalier King Charles spaniel	F	47	96	Greyhound	M	120
79	Pastore tedesco	M	78	97	Segugio	M	60

Tabella n. 1 Razza, sesso ed età dei pazienti del gruppo A (continuazione)

Gruppo B							
Id	Razza	Sesso	Età (mesi)	Id	Razza	Sesso	Età (mesi)
3	Meticcio	M	3	12	Pastore tedesco	M	57
4	Pastore tedesco	M	43	13	Meticcio	M	48
5	Meticcio	M	41	14	Meticcio	M	60
6	Pastore tedesco	M	97	17	Meticcio	M	72
7	Pastore tedesco	M	58	18	Meticcio	F	36
8	Pastore tedesco	M	72	19	Meticcio	F	132
11	Pastore tedesco	M	71				

Tabella n.2 Razza, sesso ed età degli animali del gruppo B

Nel gruppo A sono stati inclusi 84 soggetti appartenenti a 30 razze differenti e loro incroci.

Le razze maggiormente rappresentate sono il pastore tedesco, con 10 esemplari, seguito dal Labrador (6 esemplari), boxer (5 esemplari), shi-tzu e Golden retriever (4 esemplari), bassotto tedesco, basset hound (3 esemplari), setter inglese, cocker spaniel, segugio italiano, bulldog inglese, alano tedesco, cavalier King Charles spaniel, carlino, maltese, American staffordshire terrier (2 esemplari). Altre 14 razze erano rappresentate da un solo individuo. Nello studio sono inoltre stati inclusi 13 soggetti meticci.

Per quanto concerne il genere, nel gruppo A ci sono 34 soggetti maschi e 50 femmine, rispettivamente il 40,5% ed il 59,5% della popolazione considerata.

I soggetti del gruppo B sono 11 di genere maschile (84,6%) e due femminile (15,4%).

L'età media per il gruppo A è di 62,5 mesi e varia da un minimo di 7 ad un massimo di 192 mesi. Nel gruppo B, l'età media è di 60,8 mesi con una variabilità da 3 a 192 mesi.

Nella Tabella n. 3 è riportato, per ogni paziente, il motivo o i motivi per cui tale soggetto è stato riferito all'UOD.

Id	MOTIVO VISITA	Id	MOTIVO VISITA
1	Prurito	56	Otite
2	Prurito	57	Prurito
9	Prurito	58	Prurito
10	Prurito	59	Prurito
15	Prurito	60	Prurito
16	Prurito	61	Prurito
20	Prurito	62	Prurito
21	Prurito	63	Prurito
22	Prurito	64	Prurito
23	Prurito, croste	65	Prurito
24	Prurito, alopecia	66	Prurito
25	Prurito	67	Prurito
26	Prurito	68	Prurito
27	Prurito	69	Prurito
28	Prurito	70	Alopecia, croste
29	Prurito	71	Prurito
30	Prurito, pustole	72	Prurito
31	Prurito	73	Prurito
32	Prurito	74	Prurito
33	Prurito	75	Prurito
34	Prurito	76	Alopecia multifocale
35	Prurito	77	Prurito
36	Otite	78	Prurito, otite
37	Prurito	79	Otite
38	Prurito	80	Prurito
39	Otite	81	Alopecia multifocale
40	Otite	82	Prurito
41	Prurito	83	Prurito
42	Otite	84	Prurito, alopecia
43	Prurito	85	Pododermatite nodulare
44	Prurito	86	Otite
45	Otite	87	Prurito
46	Prurito	88	Prurito
47	Otite	89	Otite
48	Otite	90	Alopecia multifocale
49	Otite	91	Prurito
50	Otite	92	Prurito, alopecia
51	Otite	93	Prurito
52	Prurito	94	Alopecia diffusa
53	Prurito	95	Prurito
54	Prurito	96	Alopecia diffusa
55	Alopecia multifocale	97	Otite

Tabella n.3 Motivo della visita degli animali appartenenti al gruppo A

Il motivo della visita è stato nella maggioranza dei casi il prurito (72,6%; 61 pazienti), includendo anche i soggetti che si presentavano con più di un problema, seguito da otite (19%; 16 pazienti) ed alopecia (11,9%; 10 pazienti). Quattro pazienti si presentavano alla visita per problemi differenti da quelli fin qui elencati (pododermatite nodulare, dermatite crostosa, pustole).

Nella Tabella n. 4 sono riportati i punteggi di CADESI rilevati in 80 animali del gruppo A.

Id	CADESI	Id	CADESI	Id	CADESI
1	28	42	10	70	31
2	/	43	/	71	14
9	33	44	28	72	22
10	36	45	/	73	46
15	40	46	43	74	46
16	38	47	14	75	24
20	32	48	10	76	6
21	43	49	10	77	34
22	15	50	10	78	10
23	59	51	8	79	24
24	42	52	14	80	21
25	18	53	30	81	12
26	28	54	25	82	4
27	27	55	12	83	7
28	38	56	8	84	26
29	28	57	13	85	39
30	12	58	40	86	6
31	8	59	18	87	37
32	10	60	15	88	11
33	10	61	7	89	10
34	37	62	28	90	25
35	28	63	34	91	25
36	11	64	36	92	14
37	16	65	4	93	25
38	37	66	11	94	3
39	8	67	32	95	8
40	8	68	/	96	5
41	33	69	47	97	18

Tabella n.4 Punteggio di CADESI dei soggetti appartenenti al gruppo A

Il punteggio di CADESI dei cani del gruppo A presenta valori compresi fra 3 e 59. Il valore medio è 22,3.

Nella Tabella n. 5 sono riportati i dati riguardanti i trattamenti farmacologici, raggruppati per categoria (cortisonici, antibiotici ed antimicotici), cui sono stati sottoposti i soggetti del gruppo A precedentemente alla visita dermatologica.

Id	Cortisonici	Antibiotici	Antimicotici	Id	Cortisonici	Antibiotici	Antimicotici
1	-	✓	-	62	-	-	-
2	-	-	-	63	-	-	-
9	✓	-	-	64	✓	-	-
10	-	-	-	65	✓	✓	-
15	-	✓	-	66	✓	✓	-
16	-	-	-	67	-	-	-
20	✓	✓	-	68	✓ topici	✓	-
21	-	-	-	69	✓	✓	-
22	-	✓	-	70	-	✓	-
23	✓	✓	-	71	✓	-	-
24	-	-	-	72	✓	-	-
25	✓	✓	-	73	-	-	-
26	-	-	-	74	-	-	-
27	-	-	-	75	-	-	-
28	✓	✓	-	76	-	-	-
29	✓	-	-	77	-	✓	-
30	-	-	-	78	-	-	-
32	-	-	-	79	-	-	-
35	-	✓	-	80	-	-	-
36	✓	✓	-	81	-	-	-
37	-	-	-	82	-	✓	-
38	-	-	-	83	✓ topici	✓ topici	✓ topici
44	-	✓	-	84	-	✓	-
46	-	✓	-	85	-	✓	-
50	-	-	-	86	✓ topici	✓ topici	✓ topici
51	✓	✓	✓	87	-	✓	-
52	✓	-	-	88	✓	✓	-
53	-	-	-	89	-	-	-
54	-	-	-	90	-	-	-
55	-	-	-	91	✓	✓	-
56	✓ topici	✓ topici	✓ topici	92	-	-	-
57	✓	✓	-	93	✓	-	-
58	-	-	-	94	-	-	-
59	✓	✓	-	95	✓	-	-
60	✓	-	-	96	-	✓	-
61	-	✓ topici	-	97	-	-	-

Tabella n. 5 Trattamenti farmacologici eseguiti in 72 pazienti del gruppo A nei tre mesi precedenti la visita

È stato possibile ottenere i dati anamnestici riguardo i farmaci somministrati nei tre mesi precedenti alla visita in 72 animali su 84 considerati nel gruppo A. Di 12 soggetti l'anamnesi farmacologica è risultata muta per l'impossibilità dei proprietari di ricordare o identificare le terapie effettuate.

Il 36,2% (26 animali) dei soggetti era stato sottoposto a trattamenti con corticosteroidi ed in particolare il 30,6% (22 animali) era stato oggetto di trattamenti sistemici e i restanti di trattamenti topici.

Il 37,5% (31 animali) dei 72 pazienti era stato sottoposto a trattamenti antibiotici dei quali 27 per via sistemica (orale o iniettabile) e 4 per via topica.

Infine, solamente il 4,2% (3 pazienti) degli animali era stato sottoposto a terapie con antimicotici e in tutti i casi erano terapie topiche.

A seguire, nelle Tabelle n. 6 e 7 sono riportati i risultati dell'esame citologico eseguito in 84 pazienti dello studio, nelle tre regioni standard, a, b, c nonché del condotto uditivo esterno e delle eventuali regioni che presentavano lesioni.

Sono stati riportati prima gli animali del gruppo A ed a seguire quelli del gruppo di controllo B.

Regione corporea						
Id	Interdigitale	Ascella	Padiglione	Condotto uditivo esterno	Altre regioni	
1	✓	✓	✓			-
2	✓	-	✓	✓		-
9	✓	-	✓	-		-
10	✓	✓	-	-		✓
15	✓	-	✓	-		✓
16	✓	-	-	-		-
20	✓	-	✓	-		-
21	-	-	-	✓		-
22	✓	-	-	-		-
23	-	✓	✓	✓		-
24	✓	✓	✓	-		✓
25	✓	-	-	-		-
26	✓	-	-	-		-
27	✓	✓	✓	-		-
28	✓	✓	✓	-		-
29	✓	✓	✓	-		✓
32	-	-	-	✓		-
35	✓	✓	-	-		-
36	✓	-	-	✓		-
37	-	-	-	✓		-
38	-	-	-	-		✓
44	-	-	✓	✓		✓
46	-	-	-	-		✓
50	-	-	-	✓		-
51	-	-	-	✓		-
52	-	-	✓	-		✓
53	-	-	-	✓		-
54	✓	-	-	-		-
55	-	-	-	-		✓
56	-	-	✓	✓		-
57	-	-	-	-		✓
58	✓	-	✓	-		-
59	-	-	-	✓		-
60	✓	-	-	-		✓
61	-	-	-	✓		-
62	✓	-	-	-		✓
63	-	-	-	✓		✓
64	-	-	-	-		✓
65	-	-	-	✓		-
66	-	-	-	✓		✓
67	-	-	-	-		✓
68	-	-	-	-		✓
69	✓	-	✓	-		✓
70	-	-	-	✓		-
71	-	-	-	-		✓
72	-	✓	-	-		-
73	-	-	-	-		✓
74	✓	✓	-	-		✓
75	✓	-	-	✓		-
76	-	-	-	✓		-
77	✓	-	-	✓		✓
78	-	-	-	✓		-
79	-	-	-	✓		-
80	✓	-	-	✓		✓
81	-	-	-	✓		-
82	-	-	✓	✓		✓
83	-	-	-	✓		✓
84	-	-	-	-		✓
85	-	-	-	✓		-
86	-	-	-	✓		-
87	-	✓	✓	-		✓
88	✓	-	✓	-		-
89	-	-	-	✓		-
90	✓	-	-	-		✓
91	✓	-	-	✓		✓
92	-	-	-	-		✓
93	-	✓	-	-		-
94	-	-	-	✓		-
95	-	-	-	✓		-
96	✓	✓	-	-		✓
97	-	-	-	✓		-

Tabella n. 6 Positività citologica a *Malassezia* sp. negli animali del gruppo A

Gruppo B					
Regione corporea					
Id	Positività Citologia	Interdigitale	Ascella	Padiglione	Condotto uditivo esterno
3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	-	✓	✓	-
5	✓	-	✓	✓	-
6	✓	✓	✓	✓	-
7	✓	✓	-	✓	-
8	✓	✓	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	✓	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
17	✓	✓	-	-	✓
18	-	-	-	-	-
19	✓	-	-	-	-

Tabella n. 7 Positività citologica a *Malassezia* sp. degli animali del gruppo B

L'esame citologico delle tre regioni standard e delle aree soggette a lesione è stato eseguito in 71 cani che si presentavano per un problema dermatologico ed in 13 pazienti sani. Suddividendo i risultati nei due gruppi (malati, A e controllo, B) i risultati ottenuti sono i seguenti:

1. Nel gruppo A, la regione anatomica con la maggior frequenza di riscontro citologico di lieviti attribuibili al genere *Malassezia* è stata il condotto uditivo esterno (33 pazienti), con una frequenza di isolamento del 46,5%; seguita dalle regioni con lesioni (31 pazienti; 43,7%), gli spazi interdigitali (29 pazienti; 40,8%), faccia interna del padiglione (18 pazienti; 25,3%) ed infine regione ascellare (13 pazienti; 18,3%).
2. Nel gruppo B la regione con maggior frequenza di positività all'esame citologico è stata la faccia interna del padiglione (6 pazienti, 46,1%) seguita da spazi interdigitali (5 pazienti, 38,5%), regione ascellare (4 pazienti, 30,8%) e condotto uditivo esterno (2 pazienti, 15,4%).

Nel gruppo A il 54,9% dei pazienti è risultato positivo ad una regione corporea, il 19,7% a due, 22,5 % a tre ed il 2,8% a quattro. Nessuno è risultato negativo a tutte le regioni esaminate.

Nel gruppo B il 30,8% dei pazienti è risultato negativo in tutte le regioni esaminate; il 23,1 % si è dimostrato positivo ad una regione, il 30,8 % a due ed il 7,7% a tre e quattro siti esaminati.

Nelle Tabelle n. 8 e 9 sono presentati i risultati delle conte realizzate sui preparati citologici a livello delle regioni considerate e di una regione coinvolta da lesioni.

Gruppo A

Numero di campi a 40x positivi a *Malassezia sp.*

Id	Interdigitale						Ascella						Padiglione						Lesione					
	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E
1	-	-	2	3	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	1	4	-	
2	2	1	2	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	5	
9	-	1	1	2	-	1	5	-	-	-	-	-	3	-	-	1	1	-	-	2	-	-	1	2
10	3	2	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2
15	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	3
16	-	-	4	1	-	-	5	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-
20	-	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	1	2	2	-	-
21	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5
22	3	2	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
23	5	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
24	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-
25	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
26	-	-	-	-	-	5	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
27	3	2	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	5	-	-	-
28	1	4	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	4	-	-	-	-
29	3	2	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-

Gruppo B

Numero di campi a 40x positivi a *Malassezia sp.*

Id	Interdigitale (a)						Ascella (b)						Padiglione (c)						Lesione (d)					
	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E	0	A	B	C	D	E
3	4	1	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	5	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	5	-	-	-	-	-	1	3	-	-	1	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	4	1	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	4	1	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	4	1	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	4	1	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle n. 8 e 9 Conte eseguite nelle regioni standard ascellare, interdigitale, del padiglione ed in una lesione cutanea in 16 animali del gruppo A e 13 del gruppo B

Nel gruppo A sono state realizzate 320 conte.

Il 33,1% di tali conte è risultato negativo per la presenza di lieviti compatibili con *Malassezia sp.* Il 29,4% di tali conte ha presentato un numero di lieviti fra 1 e 5, il 7,5% fra 6 e 10, l'8,1 % fra 11 e cinquanta, il 2,8% fra 51 e 100 ed il 18,1% maggiore di 100.

Nel gruppo A il 31,2% delle conte della regione "a" è risultato negativo per la presenza di *Malassezia sp.* a 400X, il 23,8% fra 1 e 5, l'11,2% fra 6 e 10 lieviti, il 13,8% fra 11 e 50 ed il 20% maggiore di 100.

Nella regione "b" il 63,8% delle conte è risultato negativo ed il restante 36,2% ha mostrato un numero di malassezie fra 1 e 5.

Nella regione "c" è risultato negativo per la presenza di *Malassezia sp.* a 400X il 40% delle conte, il 30% fra 1 e 5, il 5% fra 6 e 10 lieviti, l'11,3% fra 11 e 50, l'1,2% fra 51 e 100 ed il 12,5% maggiore di 100.

Nella regione "d" (lesione) l'1,3% delle conte è risultato negativo; nel 27,5% sono stati contati lieviti compatibili con *Malassezia sp.* in numero fra 1 e 5, nel 13,7% fra 6 e 10, nel 7,5% fra 11 e 50, nel 10% fra 51 e 100 e nel 40% superiore a 100.

In totale negli animali del gruppo B le conte realizzate sono state 195.

L'89,2% di tali conte è risultato negativo , il 10,3% ha presentato un numero di malassezie fra 1 e 5 e lo 0,5% (un singolo campo in un singolo paziente) fra 51 e 100.

Nel gruppo B sono risultati negativi nella regione "a" il 92,3% delle conte e nel 7,7% sono state contate da 1 a 5 malassezie.

Nella regione "b" la negatività è stata osservata nell'87,7%; nel 10,8% è stata riscontrata una conta fra 1 e 5 e nell'1,5% fra 51 e 100.

Nella regione "c" è stata riscontrata negatività citologica nell'86,2% delle conte e nel 13,8% si è avuto un numero fra 1 e 5.

Le Tabelle n. 10 e 11 illustrano i risultati delle colture eseguite sui tamponi cutanei ed auricolari eseguiti in 52 dei 97 pazienti reclutati nel lavoro.

Gruppo A

ID	Dermatofiti	Malassezia	Altre positività		ID	Dermatofiti	Malassezia	Altre positività	
1	-	✓	<i>Alternaria sp</i>		34	-	✓		
2	-	✓			35	-	✓		
9	-	-			36	-	✓		
10	-	✓	<i>Cladosporium sp.</i>		37	-	-		
15	-	✓			38	-	-		
16	-	-			39	-	-		
20	-	-	<i>Candida albicans</i>		40	-	-		
21	-	-	<i>Candida famata</i>	<i>Mucor racemosus</i>	41	-	✓		
22	-	-			42	-	-	<i>Mucor sp.</i>	
23	-	✓			43	-	-	<i>Mucor sp.</i>	
24	-	✓			44	-	-	<i>Cryptococcus laurentii</i>	
25	-	-			45	-	✓		
26	-	-			46	-	-		
27	-	-			47	-	✓		
28	-	-			48	-	-		
29	-	✓	<i>Rhodotorula sp.</i>		49	-	-		
30	-	-			50	-	-		
31	-	-			51	-	✓		
32	-	✓			52	-	✓		
33	-	-							

Tabella n.10 Risultati dell'esame colturale eseguito in 39 pazienti del gruppo A

Gruppo B						
ID	Dermatofiti	Malassezia	Altre positività			
3	-	✓	<i>Ustilago cynodontis</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Scopulariopsis sp.</i>
4	-	-	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>		
5	-	-	<i>Cladosporium sp.</i>			
6	-	-	<i>Cladosporium sp.</i>			
7	-	-	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>			
8	-	-	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>		
11	-	-	<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Trichosporon sp.</i> <i>Geotrichum silvicola</i>
12	-	-	<i>Fusarium Oxysporum</i>			
13	-	✓	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	<i>Candida albicans</i>		
14	-	✓	<i>Candida albicans</i>			
17	-	-	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	<i>Mucor sp.</i>
18	-	-	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Mucor racemosus</i>	<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
19	-	-				

Tabella n.11 Risultati dell'esame colturale negli animali del gruppo B

Sono stati eseguiti in totale 142 esami colturali ripetuti nei terreni Sabouraud destrose agar e Dixon agar per la ricerca di lieviti e su terreno selettivo Mycobiotic agar per la ricerca dei dermatofiti.

Un totale di 64 isolati fungini, 33 nel gruppo A e 31 nel gruppo B, è stato recuperato dalle colture eseguite nei 52 pazienti considerati.

L'esame colturale per la ricerca dei dermatofiti è risultato negativo in tutti i 142 campioni testati, includendo tutte le regioni testate del gruppo A e del gruppo B.

Dei cinquantadue animali testati sono risultati positivi ad almeno un esame colturale per *Malassezia pachydermatis* 19 animali, 16 nel gruppo A e 3 nel gruppo B.

In base alle caratteristiche colturali, morfologiche e biochimiche tutti i ceppi isolati appartengono alla specie *Malassezia pachydermatis*; nessun'altra specie di questo genere è stata isolata.

Nel gruppo A il 20,5% dei pazienti è risultato positivo ad almeno un altro fungo saprofita diverso da *Malassezia pachydermatis*; nel 2,6% dei pazienti è stata verificata la positività a due o più saprofiti fungini.

Nel gruppo B il 92,3% dei pazienti è risultato positivo ad almeno un altro fungo saprofita diverso da *Malassezia pachydermatis*; nel 53,8% degli animali del gruppo B si è rilevata una positività a due o più funghi saprofiti.

Nei 52 animali considerati, fra i saprofiti fungini il 16,2% è rappresentato da *Cladosporium spp.*, il 13,5% da *Alternaria spp.* e *Mucor spp.*; il restante 56,8% è costituito da ulteriori 24 differenti specie.

Nelle Tabelle n. 11 e 12 sono riportati i risultati, a confronto, della citologia e dell'esame colturale per *Malassezia sp.* dei 142 campioni analizzati, 98 del gruppo A e 44 del gruppo B.

Gruppo A							
Id	Regione	Citologia	Coltura	Id	Regione	Citologia	Coltura
1	a	✓	-	24	a	✓	-
	b	✓	✓		b	✓	-
	c	✓	-		c	✓	-
	d	✓	-		d	✓	✓
2	a	-	-	25	e	✓	-
	b	✓	✓		a	-	-
	c	✓	-		b	-	-
	d	✓	-		c	✓	-
	e	✓	✓		d	✓	-
9	a	✓	-	26	a	-	-
	b	-	-		b	-	-
	c	✓	-		c	✓	-
	d	✓	-		d	✓	-
10	a	✓	✓	27	a	✓	-
	b	✓	✓		b	✓	-
	c	✓	-		c	✓	-
	d	✓	-	28	a	✓	-
15	a	-	✓		b	✓	-
	b	-	-		c	✓	-
	c	✓	✓		d	✓	-
	d	✓	-	29	a	✓	✓
	e	✓	-		b	✓	-
16	a	-	-		c	✓	-
	b	✓	-		d	✓	-
	c	✓	-		e	✓	-
20	a	-	-	30	a	✓	-
	b	✓	-	31	a	✓	-
	c	✓	-	32	a	✓	✓
	d	✓	-	33	a	✓	-
	e	✓	-	34	a	✓	✓
21	a	-	-	35	a	✓	✓
	b	✓	-	36	a	✓	-
	c	-	-	b	✓	✓	
	d	✓	-	37	a	✓	-
22	a	✓	-	38	a	✓	-
	b	✓	-	39	a	✓	-
	c	✓	-	40	a	✓	-
	d	✓	-				
23	a	✓	-				
	b	✓	-				
	c	-	-				
	d	✓	✓				

Tabella n.12 Positività a *Malassezia* sp. determinate con esame citologico e colturale negli animali del gruppo A

Gruppo B			
Id	Regione	Citologia	Coltura
3	a	✓	✓
	b	✓	✓
	c	✓	-
	d	✓	-
	e	✓	✓
4	a	-	-
	b	✓	-
	c	✓	-
5	a	✓	-
	b	✓	-
	c	✓	-
6	a	✓	-
	b	✓	-
	c	✓	-
7	a	✓	-
	b	-	-
	c	✓	-
8	a	✓	-
	b	-	-
	c	-	-
11	a	-	-
	b	-	-
	c	-	-
12	a	-	-
	b	✓	-
	c	-	-
13	a	-	-
	b	-	✓
	c	-	-
	d	✓	-
	e	✓	-
14	a	-	-
	b	-	-
	c	-	-
17	a	-	-
	b	-	-
	c	✓	-
	d	✓	-
18	a	-	-
	b	-	-
	c	-	-
19	a	-	-
	b	-	-
	c	-	-

Tabella n.13 Positività a *Malassezia* sp. determinate con esame citologico e colturale negli animali del gruppo B

Gli esami citologici sono risultati positivi alla presenza di lieviti compatibili per caratteristiche morfologiche con *Malassezia pachydermatis* in 106 campioni su 142, 85 nel gruppo A e 21 nel gruppo B.

Dei tamponi seminati in Dixon agar sono risultati positivi per lieviti compatibili con il genere *Malassezia* 25 campioni, 21 nel gruppo A e 4 nel gruppo B.

Tutti i 25 ceppi isolati sono risultati in grado di crescere anche sul terreno Saboureaud e quindi sono stati identificati con *Malassezia pachydermatis*.

Nel gruppo A le positività all'esame citologico sono l'86,6% dei campioni considerati mentre l'esame colturale si è presentato positivo nel 22,3% dei casi.

Nel gruppo B sono risultate positive alla citologia il 47,7% delle regioni corporee analizzate mentre la coltura ha mostrato una positività del 9,1%.

Nel gruppo A, di tutti i campioni risultati positivi all'esame citologico è confermata la positività all'esame colturale nel 23,7% dei casi; se al contrario consideriamo i campioni risultati positivi all'esame colturale, la positività è confermata all'esame citologico nel 92,6% dei casi.

Nella tabella n. 14 è riportato il risultato dell'indagine biomolecolare eseguita su sedici isolati di lieviti, tredici del gruppo A e tre del gruppo B.

	Id	Localizzazione anatomica	PCR
GRUPPO A	1	Padiglione	<i>M. pachydermatis</i>
	2	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>
		Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>
	10	Interdigitale	<i>M. pachydermatis</i>
		Perivulvare	<i>M. pachydermatis</i>
	15	Ascella	<i>M. pachydermatis</i>
		Padiglione	<i>M. pachydermatis</i>
	23	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>
	32	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>
	51	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>
52	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>	
GRUPPO B	3	Interdigitale	<i>M. pachydermatis</i>
		Ascella	<i>M. pachydermatis</i>
	13	Padiglione	<i>M. pachydermatis</i>
	14	Condotto uditivo esterno	<i>M. pachydermatis</i>

Tabella n. 14 Identificazione biomolecolare eseguita in 13 isolati dei pazienti del gruppo A e 3 del gruppo B

In tutti i casi è stata confermata l'appartenenza dei lieviti alla specie *Malassezia pachydermatis*.

Sette isolamenti sono avvenuti da tamponi eseguiti dal condotto uditivo esterno, tre dalla faccia interna del padiglione, due dalla regione ascellare e dall'interdigitale ed una dalla regione perivulvare.

DISCUSSIONE

Lo studio clinico oggetto del presente lavoro ha coinvolto inizialmente 97 animali di cui 84 con sovraccrescita di *Malassezia* sp.

Lo schema utilizzato per la raccolta dei dati anamnestici e per l'esecuzione della visita clinica si è rivelato un utile strumento nella maggior parte dei pazienti, con l'eccezione di alcuni casi in cui, per mancanza di compliance del proprietario o perchè erano stati trattati con farmaci non noti, dal veterinario referente, non è stato possibile ottenere tutte le informazioni ed i dati necessari allo studio.

In letteratura la predisposizione di razza è oggetto di dibattito. Nell'ultimo lavoro che ha analizzato questo aspetto dei fattori predisponenti la dermatite da *Malassezia* (Machado *et al.*, 2011) non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa nella distribuzione di razza. Nel passato, invece, numerosi lavori (Brito *et al.*, 2008, Girao *et al.*, 2006, Cafarchia *et al.*, 2005a, Prado *et al.*, 2004, Bensignor *et al.*, 2002; Bond *et al.*, 1997; Bond *et al.*, 1996) avevano rilevato un'elevata incidenza nel basset hound, bassotto tedesco, cocker spaniel, West Highland white terrier e cane barbone. Nessuna delle razze qui elencate si ritrova in numero rilevante nel presente lavoro.

La diffusione delle razze nella popolazione di riferimento del presente lavoro non è conosciuta e ciò non permette di stabilire la significatività delle differenze evidenziate.

Le cinque razze maggiormente rappresentate nel presente lavoro, pastore tedesco, Labrador, boxer, shi-tzu e golden retriever non sono presenti fra quelle che sembrano più predisposte alla dermatite da *Malassezia*, in base alla maggioranza degli studi esaminati. Tuttavia, in lavori singoli, come quello di Bond e colleghi del 1996 o quello di Plant e colleghi del 1992 è emersa una sovra rappresentazione, rispetto alla popolazione di riferimento, del cane boxer, nel primo lavoro citato, e

del pastore tedesco nel secondo studio nominato. In particolare nel pastore tedesco la predisposizione alla sovraccrescita di *Malassezia* è attribuita dagli autori alla seborrea idiopatica primaria, che colpisce tale razza con un'elevata frequenza. L'alterazione del microclima cutaneo, in questi pazienti, favorirebbe la proliferazione dei lieviti (Plant *et al.*, 1992).

Sulla base della letteratura esaminata (Machado *et al.*, 2011; Yurayart *et al.*, 2011; Girao *et al.*, 2006; Nardoni *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002) non è mai stata riscontrata alcuna variazione significativa nei soggetti maschi rispetto alle femmine, né considerando la predisposizione a presentare dermatite da *Malassezia* né considerando il numero di lieviti presenti negli animali sani.

Tale uniformità di risultati può far ipotizzare che la differenza riscontrata nel presente lavoro fra numero di soggetti maschi e numero di femmine sia da mettere in relazione con una differenza nella distribuzione dei generi all'interno della popolazione di riferimento.

Eguale a ciò che accade per il genere, in letteratura, non emerge alcuna predisposizione in base all'età, se si considerano i campionamenti dalla cute, a differenza di quanto sembra accada nel condotto uditivo esterno. Girao, infatti, in uno studio del 2006 evidenziò una predisposizione, a presentare positività alle colture per *Malassezia*, negli animali fra uno e tre anni di età.

I risultati inerenti l'età raccolti nel presente lavoro permettono di fare alcune considerazioni generali. Nella maggior parte dei lavori esaminati (Machado *et al.*, 2011; Nardoni *et al.*, 2004; Crespo *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2002) come nel presente lavoro, l'età riportata nel segnalamento è quella del momento della visita dermatologica e della diagnosi di sovraccrescita di *Malassezia*. Nella maggior parte dei pazienti, però, non si tratta della prima manifestazione sintomatologica e, sovente, ci si trova di fronte pazienti con alle spalle una storia dermatologica molto

lunga. L'anamnesi accurata può risalire, in alcuni casi, al momento della vita dell'animale nel quale per la prima volta si sono manifestati i sintomi ma nulla ci assicura che tali sintomi fossero da attribuirsi allo stesso problema riscontrato durante la visita. È quindi opinione dell'Autore che eventuali predisposizioni d'età siano da considerarsi con estrema cautela.

Come segnalato dalla letteratura scientifica (Machado *et al.* 2011, Gross *et al.*, 2005, Scott *et al.*, 2001, Mason ed Evans, 1991) il segno clinico più costante nella dermatite da *Malassezia* è il prurito. Tale rilievo giustifica il risultato ottenuto dal presente lavoro che pone al primo posto il prurito fra le motivazioni per cui i pazienti con dermatite o otite da *Malassezia* vengono portati in visita.

Il prurito è spesso associato a lesioni quali eritema, desquamazione e croste cui si aggiungono, nei casi in cui la malattia si cronicizza, lichenificazione ed iperpigmentazione (Gross *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2001).

Alla sovraccrescita di *Malassezia*, nel 40% dei pazienti canini, è associata un'infezione da stafilococchi che può alterare ed aggravare il quadro clinico dermatologico (Guaguère e Prélaud, 1996).

Un solo studio in letteratura (Machado *et al.*, 2011) ha utilizzato il metodo CADESI-03 (Olivry *et al.*, 2007) per la descrizione della gravità delle lesioni in pazienti con dermatite da *Malassezia*. In tale lavoro i valori di CADESI dei pazienti positivi alla coltura risultarono più elevati rispetto ai negativi ed inoltre fu osservata una correlazione positiva tra il grado di CADESI ed il numero di colonie rilevate all'esame colturale.

Non essendo però riportati i valori di CADESI riscontrati nei pazienti dello studio di Machado risulta impossibile una comparazione con i dati del presente lavoro.

Inoltre come sottolineano gli autori di tale lavoro il CADESI è stato validato solamente nella dermatite atopica canina e potrebbe non risultare adatto a

giudicare la gravità dei casi di dermatite da *Malassezia*. Tuttavia nell'ambito della clinica dermatologica possedere un metodo di valutazione delle lesioni, per evidenziare l'evoluzione clinica del paziente, risulta di fondamentale importanza. La speranza per il futuro è che si aggiungano ulteriori lavori che considerano tale dato e che si possa evidenziare l'eventuale utilità di questo metodo anche in patologie differenti dalla dermatite atopica.

A conoscenza dell'Autore come già affermato da Scott nel 2001, non esistono studi conclusivi sull'effetto dei trattamenti farmacologici antibiotici e cortisonici sulla popolazione di *Malassezia pachydermatis*, nonostante alcuni lavori del passato ne abbiano suggerita l'esistenza (Mauldin *et al.*, 1997, Bond *et al.*, 1996, Mason e Stewart, 1993, Plant *et al.*, 1992).

Analizzando i dati presentati nel presente lavoro appare chiaro che la maggioranza dei pazienti con sovraccrescita di *Malassezia* non era stata sottoposta a trattamenti farmacologici. È possibile che trattamenti antibiotici alterino il normale rapporto esistente fra i residenti della flora cutanea favorendo un'eventuale sovraccrescita di lieviti ma è anche riscontro comune nella pratica dermatologica il rilievo di una sovraccrescita di *Malassezia* associata ad infezione batterica da stafilococchi.

Inoltre in tutti i pazienti esaminati è stata sospettata o diagnosticata una malattia primaria sottostante riferibile ai tre grandi gruppi delle patologie cutanee allergiche, difetti primari della cheratinizzazione ed endocrinopatie. Nessuno dei pazienti in cui è stata riscontrata una sovraccrescita di *Malassezia* era sottoposto a trattamenti immunosoppressivi per patologie autoimmunitarie.

Nonostante non sia possibile eseguire un confronto con una popolazione di controllo non affetta da nessuna delle patologie precedentemente citate e sottoposta agli stessi trattamenti farmacologici, si può azzardare che, se anche esiste una predisposizione dei pazienti che subiscono trattamenti antibiotici e

cortisonici a presentare una sovraccrescita di *Malassezia* sp., ciò non sembra essere il fattore causale prevalente.

I risultati del presente lavoro inerenti alla positività delle regioni corporee analizzate, sembrano essere in linea con quanto riportato da alcuni Autori (Prado *et al.*, 2008, Nardoni *et al.*, 2007, Bond *et al.*, 1995b) che rilevarono una predisposizione del condotto uditivo esterno e degli spazi interdigitali a presentare una popolazione di *Malassezia* sp. evidenziabile con esame citologico.

Al contrario altri lavori del passato recente (Yurayart *et al.*, 2011, Brito *et al.*, 2008) mostrarono una maggior frequenza d'isolamento in regioni quali il collo, l'inguine e la regione perianale.

Si può ipotizzare che possano contribuire a tale discrepanza numerosi fattori, fra i quali l'assenza di standardizzazione delle metodiche di prelievo adottate (tipologia di supporto per il prelievo, superficie di campionamento) come anche influenze legate a fattori del soggetto campionato.

Inoltre non si può nemmeno escludere che vi siano differenze legate a condizioni climatiche regionali e stagionali (temperatura, umidità relativa) che possano influire sul numero di lieviti presenti a livello cutaneo come già ipotizzato in altri lavori (Machado *et al.*, 2003, Kumar *et al.*, 2002, Duarte *et al.*, 2001).

Infine, riscontrando sovraccrescita di *Malassezia pachydermatis* in pazienti con malattie dalla patogenesi molto differente (es. patologie allergiche ed endocrinopatie) si può pensare che fattori inerenti alla patologia primaria, non ancora adeguatamente studiati, possano influenzare la popolazione cutanea di lieviti.

Confrontando i dati del gruppo A e B emerge una lieve differenza nella frequenza di positività a livello delle regioni standard. Il condotto uditivo esterno, infatti, nel secondo gruppo risulta raramente positivo all'esame citologico.

Tale differenza si può ipotizzare derivi in parte dall'influenza delle patologie primarie (es. dermatite atopica), presenti negli animali del gruppo A, sullo sviluppo dell'otite esterna. Anche la scarsa numerosità del gruppo B potrebbe giustificare un'asimmetria nella distribuzione anatomica di *Malassezia pachydermatis*, negli animali sani rispetto ai malati.

Dall'analisi della letteratura emerge com'è costante nel tempo l'obiettivo di comprendere le differenze fra cani sani e affetti da malattie dermatologiche per quanto riguarda la popolazione cutanea di *Malassezia pachydermatis*. Le malattie considerate sono tutte quelle che possono comportare difetti primari della cheratinizzazione, sviluppo di eritema o seborrea o che determinano anomalie dell'immunità cellulo-mediata.

Solo recentemente s'inizia a comprendere che non solo il numero ma anche la tipologia di ceppo, con la variabilità nella produzione fosfolipidica, sia determinante nello sviluppo delle lesioni della dermatite da *Malassezia* (Cafarchia e Otranto, 2004).

La differenza appare nella maggior parte dei casi sostanziale, con conte numericamente molto più elevate nei pazienti malati rispetto ai sani, sia considerando la sede delle lesioni cutanee (Yurayart *et al.*, 2011; Cafarchia *et al.*, 2005a; Nardoni *et al.*, 2004; Bond e Lloyd, 1997) sia considerando regioni standard (Machado *et al.*, 2011).

Nel presente lavoro la differenza riscontrata nel numero di lieviti a livello delle regioni anatomiche standard (a, b, c) fra i pazienti del gruppo A ed i soggetti del gruppo B ed in particolare la frequenza di negatività (33,1% vs 92,3%) conferma quanto rilevato da numerosi studi che hanno indagato questo aspetto dell'eziopatogenesi della dermatite da *Malassezia* (Machado *et al.*, 2011; Yurayart *et al.*, 2011; Cafarchia *et al.*, 2005a; Nardoni *et al.*, 2004; Bond e Lloyd, 1997).

Anche il riscontro di conte numericamente superiori a livello del condotto uditivo esterno (sede di lesione in molti dei pazienti considerati) e degli spazi interdigitali

trova conferma in quanto già riscontrato da Nardoni e colleghi nel 2006 e da Cafarchia e colleghi nel 2005a.

Come segnalato in alcuni lavori (Cabanès *et al.*, 1996, Aho, 1983) fra i funghi commensali più frequenti sulla cute del cane si ritrovano *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Aspergillus spp.* e *Scopulariopsis spp.*

I risultati del presente lavoro sono perfettamente in linea con quanto riscontrato in precedenza.

Candida albicans, è stata frequentemente riscontrata come commensale delle giunzioni mucocutanee e delle mucose del cane (Moretti *et al.*, 2004) ma in determinate condizioni di alterato microclima e squilibrio della flora cutanea si può comportare come agente patogeno (Moretti *et al.*, 2006, Mueller *et al.*, 2002). In condizioni normali non è riscontrata come normale abitante della cute.

La presenza di *C. albicans* a livello cutaneo, così come di altri microrganismi caratteristici delle mucose, potrebbe essere giustificabile, in pazienti affetti da prurito, in conseguenza del leccamento, manifestazione tipica della sintomatologia pruriginosa.

Confrontando i risultati del gruppo A e del gruppo B e prendendo in considerazione solamente la positività a *Malassezia* e non la carica di lieviti, sia la tecnica citologica sia l'esame colturale mostrano valori di positività che si discostano molto fra i due gruppi suggerendo che vi è una notevole superiorità nella presenza di lieviti del genere *Malassezia* negli animali malati rispetto agli animali sani. Tale risultato è in completo accordo con quanto rilevato anche in studi recenti, come quello di Machado e colleghi del 2011, nel quale si confrontò un gruppo di animali sani con un gruppo di animali con sintomatologia compatibile con una dermatite da *Malassezia*.

Il rapporto fra gli esiti dell'esame citologico e colturale nei soggetti con sovraccrescita di *Malassezia sp.* è stato ampiamente studiato (Machado *et al.*, 2011, Girao *et al.*, 2006, Cafarchia *et al.*, 2005a, Bensignor *et al.*, 2002, Kennis *et al.*, 1996, Plant *et al.*, 1992). In tali studi è confermata l'utilità della citologia come metodo diagnostico nella pratica clinica dermatologica ma è suggerito l'utilizzo dell'esame colturale nei protocolli di ricerca poiché tale metodo è ritenuto possedere una sensibilità più elevata.

I risultati del presente lavoro su tale rapporto appaiono in contrasto con la letteratura prevalente giacché l'esame citologico sembra essere dotato di una sensibilità maggiore nell'identificare una sovraccrescita di *Malassezia* rispetto all'esame colturale.

La spiegazione di tale differenza non è chiara; si possono formulare le seguenti ipotesi:

1. Un errore nell'interpretazione citologica, derivato dall'eventuale inclusione nella conta di lieviti simili a *Malassezia sp.*; pur non potendo escludere con assoluta certezza tale falso positivo, il miglioramento clinico ottenuto nei pazienti del presente studio, in seguito alla terapia antimicotica, non sembra supportare tale ipotesi.
2. Una scarsa conservabilità dei ceppi di lievito, prelevati con la tecnica del tamponcino di cotone imbevuto di soluzione fisiologica o uno scarso campionamento legato all'insufficiente strofinamento sulla cute.
3. Differenze nelle tecniche di prelievo citologico e nell'allestimento dei preparati riscontrate fra il presente lavoro e quelli presenti in letteratura. Ad esempio nello studio eseguito da Cafarchia e colleghi nel 2005a, che rilevò una bassa sensibilità della tecnica citologica, la metodica utilizzata non fu quella dello scotch ma quella del tamponcino di cotone rotolato su vetrino; tale tecnica è dimostrato possedere minor sensibilità (Omodo-Eluk *et al.*, 2003). Inoltre, negli studi che hanno utilizzato la citologia su scotch, è

segnalato l'utilizzo del Diff-Quick® come tecnica di colorazione. Non è riportato se tale metodica fosse applicata come da protocollo o se modificata saltando il primo passaggio della fissazione a base alcolica (metanolo). Se così non fosse, l'alcol presente nella soluzione potrebbe essere responsabile di una perdita parziale del preparato per azione solvente sulla colla dello scotch.

4. Scarsa conservabilità dei preparati citologici. Dalla lettura dell'articolo di Bensignor e colleghi del 2002, che è citato sovente quale caposaldo della teoria di supremazia della coltura rispetto alla citologia, s'intuisce che i preparati citologici siano stati conservati e letti successivamente alle visite dermatologiche e non contestualmente ad esse. Pur non essendo presente in letteratura nessuno studio a supporto di ciò, è di osservazione frequente nella pratica clinica dermatologica il riscontro di una scarsa conservabilità dei preparati citologici eseguiti con la tecnica dello scotch. Osservando citologici contestualmente al loro allestimento e dopo alcuni giorni è frequente non riscontrare più la presenza dei lieviti inizialmente evidenziati.

Ulteriori analisi e comparazioni dovranno essere effettuate per chiarire quale fra le presenti ipotesi sia maggiormente supportata da dati oggettivi.

Dall'esame della letteratura (Yurayart *et al.*, 2011, Machado *et al.*, 2011, Brito *et al.*, 2009) emerge come *Malassezia pachydermatis* sia la specie prevalente nel cane, anche se specie come *Malassezia furfur*, in alcuni lavori, sono isolate in percentuali variabili da 0,3% (Machado *et al.*, 2011) a 5% circa (Cafarchia e Otranto, 2004) dei campioni.

Nel presente lavoro, all'interno del genere *Malassezia*, non sono state messe in evidenza specie differenti da *M. pachydermatis*.

La spiegazione del mancato isolamento di specie differenti risiede molto probabilmente nella bassa numerosità del campione considerato anche se non si può escludere come ipotizzato da Machado e colleghi nel 2011 che il riscontro di specie differenti non sia in relazione con un loro ruolo patogeno ma sia legato ad una semplice funzione di veicolo, svolta dal cane, nei confronti di specie tipiche dell'uomo.

CONCLUSIONI ED IMPLICAZIONI

Il presente studio ha permesso di confermare ed ampliare le informazioni disponibili sulla dermatite ed otite da *Malassezia*.

Lo studio dei fattori dell'ospite e dei fattori esogeni che secondo la letteratura potrebbero influenzare lo sviluppo della dermatite da *Malassezia*, nonché gli aspetti clinici di tale patologia ha portato a risultati che confermano quanto già pubblicato.

La localizzazione anatomica e la frequenza rilevata di *Malassezia pachydermatis* non differisce da quanto osservato in numerosi studi del passato. Ciò ha inoltre permesso di confermare che la numerosità dei lieviti è uno dei fattori sostanziali per lo sviluppo dei segni clinici della dermatite da *Malassezia*.

L'aspetto più interessante evidenziato dal presente lavoro, ad opinione dell'autore, è sicuramente il rapporto fra gli esiti dell'esame citologico e quelli dell'esame colturale. I risultati ottenuti appaiono in contrasto con quanto affermato in letteratura. L'esame citologico, realizzato con la tecnica del nastro adesivo e colorato con la tecnica Diff-Quick® modificata risulta maggiormente sensibile rispetto all'esame colturale, nel rilevare una sovraccrescita di *Malassezia*.

L'unica specie del genere *Malassezia* isolata è stata *M. pachydermatis* e ciò consente di escludere, nella popolazione esaminata, la presenza di specie lipido-dipendenti.

Si auspica che in futuro un contributo alle conoscenze disponibili possa derivare dall'approfondimento di aspetti clinici correlabili alle variazioni genotipiche del lievito e dell'ospite, eventualmente utilizzando strumenti di monitoraggio dell'evoluzione clinica quali il CADESI.

BIBLIOGRAFIA

Aho, R. (1983) Saprophytic fungi isolated from the hair of domestic and laboratory animals with suspected dermatophytosis. *Mycopathologia* 83: 65-73

Akerstedt, J. e Vollset, I. (1996) *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. *British veterinary Journal* 152:269-80.

Archer-Dubon, C., Icaza-Chivez, M.E., Orozco-Topete, R., Reyes, E., Baez-Martinez, R. e Ponce de Leon, S. (1999) An epidemic outbreak of *Malassezia* folliculitis in three adult patients in an intensive care unit: a previously unrecognized nosocomial infection. *International Journal of Dermatology* 38: 453-6.

Ashbee, H. R., Muir, S. R., Cunliffe, W. J. e Ingham, E. (1997) IgG subclasses specific to *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* in patients with acne vulgaris. *British Journal of Dermatology* 136:730-33.

Ashbee, H.R. (2006) Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. *Immunology and medical microbiology*. 47: 14-23.

Ashbee, H.R. (2007) Update on the genus *Malassezia*. *Medical Mycology* 45: 287-303.

Ashbee, H.R., Evans E.G. (2002) Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 21-57.

Bandhaya, M. (1993) The distribution of *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* on normal human skin. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 24:343-346.

Barfatani, M., Munn, R.J. e Schjeide, D.A. (1964) An ultrastructural study of *Pityrosporum orbiculare*. *Journal of Investigative Dermatology* 43: 231–3.

Baroni, A., Perfetto, B., Paoletti, I., Ruocco, E., Canozo, N., Orlando, M. e Buommino, E. (2001) *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesion molecule and cytokine expression. *Archives of Dermatological Research* 293: 414–19.

Barret-Bee, K., Hayes K. Y., Wilson R. G. e Ryley J. F. (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol* 131:1217–1222.

Baxter, M. (1976) The association of *Pityrosporum pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* 17: 231–4.

Belew, P.W., Rosenberg, E.W., Jennings, B.R. (1980) Activation of the alternative pathway of complement by *Malassezia ovalis* (*Pityrosporum ovale*). *Mycopathologia* 70: 187–91.

Bensignor, E. (2006) Oral itraconazole as a pulse therapy for the of canine *Malassezia* dermatitis: a randomized, blinded, comparative trial. *Pratique Médicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie* 41: 69–72.

Bensignor, E., Jankowski, F., Seewald, W., Touati, F., Deville, M. e Guillot, J. (2002) Comparison of two sampling techniques to assess quantity and distribution of *Malassezia* yeasts on the skin of healthy basset hounds. *Veterinary Dermatology* 13: 237–41.

Bergbrant, I.M. e Faergemann, J. (1988) Variations of *Pityrosporum orbiculare* in middle-aged and elderly individuals. *Acta Dermato-Venereologica* 68: 537–40.

Bibel, D. J., Aly, R., Shah, S. e Shinefield, H.R. (1993) Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. *Acta Dermato-Venereologica* 73:407–411.

Boardman, C. R., e Malkinson, F.D. (1962) *Tinea versicolor* in steroid treated patients. *Archives of Dermatology* 85:84–92.

Bond, R. e Anthony, R.M. (1995) Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 537–42.

Bond, R. e Lloyd, D.H. (1997) Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic basset hounds. *Veterinary Dermatology* 8: 101–6.

Bond, R. e Lloyd, D.H. (2002) Immunoglobulin G responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. *Veterinary Record* 150: 509–12.

Bond, R. e Sant, R.E. (1993) The recovery of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Veterinary Dermatology Newsletter* 15:25.

Bond, R., Collin, N.S. e Lloyd, D.H. (1994) Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Journal of Small Animal Practice* 35: 68-72.

Bond, R., Curtis, C.F., Hendricks, A., Ferguson, E.A. e Lloyd, D.H. (2002) Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Veterinary Record* 150: 448–9.

Bond, R., Elwood, C.M., Littler, R.M. Pinter, L. e Lloyd, D.H. (1998) Humoral and cell-mediated responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy dogs and dogs with *Malassezia* dermatitis. *Veterinary Record* 143: 381–4.

Bond, R., Ferguson, E.A., Curtis, C.F., Craig, J.M. e Lloyd, D.H. (1996) Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. *Journal of small animal practice* 37: 103-7.

Bond, R., Patterson-Kane, J.C. e Lloyd, D.H. (2004) Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology* 42: 165–75.

Bond, R., Patterson-Kane, J.C.; Perrins, N. e Lloyd, D.H. (2006) Patch test responses to *Malassezia pachydermatis* in healthy basset hounds and in basset hounds with *Malassezia* dermatitis. *Medical Mycology* 44: 419-27.

Bond, R., Rose, J.F., Ellis, J.W. e Lloyd, D.H. (1995a) Comparison of two shampoos for treatment of *Malassezia pachydermatis*-associated seborrhoeic dermatitis in basset hounds. *Journal of Small Animal Practice* 36: 99–104.

Bond, R., Saijonmaa-Koulumies, L.E. e Lloyd, D.H. (1995b) Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *Journal of Small Animal Practice* 36: 147–50.

Bond, R.(2010) Superficial veterinary mycoses. *Clinics in Dermatology* 28:226-36.

Bond, R. e Lloyd, D.H. (1995) Evaluation of a detergent scrub technique for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. *Research in Veterinary Science* 58: 133-37.

Brito, E.H.S., Fontenelle, R. O.S., Brilhante, R. S.N., Cordeiro, R. A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. e Rocha, M.F.G (2009) The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. *The veterinary journal* 182: 320-26.

Brito, E.H.S., Fontenelle, R.O.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Soares Junior, F.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. e Roca, M.F.G. (2007) Phenotypic characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia pachydermatis* strains from dogs. *The veterinary journal* 174: 147-53.

Broberg, A., Faergemann, J., Johansson, S., Johansson, S.G., Strannegård, I.L. e Svejgaard, E. (1992) *Pityrosporum ovale* and atopic dermatitis in children and young adults. *Acta Dermato-Venereologica* 72: 187–92.

Buentke, E., Heffler, L.C., Wallin, R.P.A., Löfman, C., Ljunggren, H.G. e Scheynius A. (2001) The allergenic yeast *Malassezia furfur* induces maturation of human dendritic cells. *Clinical and Experimental Allergy* 31: 1583–93.

Cabañes, F.J., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. e Castellà, G. (1996) Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia* 133: 1-7.

Cabañes, F.J., Vega, S. e Castellà, G. (2010) *Malassezia cuniculi* sp. a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Medical Mycology* 49:40-8.

Cabañes, S.J., Theelen, B., Castella, G. e Boekhout, T. (2007) Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *Yeast research* 7: 1064-76..

Cafarchia C., Latrofa M.S., Figueredo L.A., da Silva Machado, M.L., Ferreiro L., Guillot J., Boekhout, T. e Otranto, D. (2011a) Physiological and molecular characterization of a typical lipid dependent *Malassezia* yeasts from a dog with skin lesions: adaptation to a new host? *Medical Mycology* 49:365-74.

Cafarchia, C. e Otranto, D. (2004) Association between phospholipase production by *Malassezia pachydermatis* and skin lesions. Journal of clinical microbiology 42: 4868-9.

Cafarchia, C., Gallo, S., Danesi, P., Capelli, G., Paradies, P., Traversa, D., Gasser, R.B. e Otranto, D. (2008) Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. Acta Tropica 107:25-29.

Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J. e Otranto, D. (2005a) Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation 17: 316-22.

Cafarchia, C., Gasser, R.B., Figueredo, L.A., Latrofa, M.A. e Otranto, D. (2011b) Advances in the identification of *Malassezia*. Molecular and Cellular Probes 25:1-7.

Cafarchia, C., Latrofa, S.M., Testini, G., Parisi, A., Guillot, J., Gasser, R.B. e Otranto D. (2007) Molecular characterization of *Malassezia* isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. Molecular and Cellular Probes 21:229-38.

Cafarchia, C.; Gallo, S.; Capelli, G. e Otranto D. (2005b) Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. Mycopathologia 160: 143-9.

Cannon, P.F. (1986) International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Part 2. Microbiological Science 3: 285-7.

Carlotti, D.N. e Laffort-Dassot, C. (1996) Dermatite à *Malassezia* chez le chien: étude bibliographique et rétrospective de 12 cas généralisés traités par des dérivés azolés. Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie 31:297.

Chang, H.J., Miller, H., Watkins, N., Arduino, M.J., Ashford, D.A., Midgley, G., Agüero, S.M., Pinto-Powell, R., von Reyn, C.F., Edwards, W., McNeil, M.M. e Jarvis, W.R. (1998) An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers_ pet dogs. *New England Journal of Medicine* 338: 706–11.

Chen, T.A. e Hill, P.B (2005) The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin. *Veterinary Dermatology* 16: 4–26.

Chen, T.A., Halliwell, R.E.W. e Hill, P.B. (2002a) Failure of extracts from *Malassezia pachydermatis* to stimulate canine keratinocyte proliferation *in vitro* *Veterinary Dermatology* 13: 323–329 .

Chen, T.A., Halliwell, R.E.W. e Hill, P.B. (2002b) IgG responses to *Malassezia pachydermatis* antigens in atopic and normal dogs. In: Thoday KL, Foil CS, Bond R, eds. *Advances in Veterinary Dermatology*. Oxford, England: Blackwell Science 4: 202–209.

Chen, T.A., Halliwell, R.E.W., Pemberton, E.D. e Hill P.B. (2002c) Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Veterinary dermatology*. 13: 141-50.

Coutinho, S. D. e Paula, C.R. (2000). Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology* 38:73–76.

Coutinho, S.D.A. (2005) *Malassezia pachydermatis*: enzymes production in isolates from external ear canal of dogs with and without otitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57:149-53.

Crespo, M.J., Abarca, M.L. e Cabanes, F.J.(2000) Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. Journal of clinical microbiology 38: 2383-5.

Cunningham, A. C., E. Ingham, e Gowland G. (1992) Humoral responses to *Malassezia furfur* serovars A, B and C in normal individuals of various ages. British Journal of Dermatology 127:476-481 .

Curvale-Fauchet, N., Botterel, F., Legrand, P., Guillot, J., Bretagne, S. (2004) Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp in adult patients. Mycoses 47: 491-4.

Day, M.J. (1996) Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal Langerhans' cells and keratinocytes in canine dermatological disease. Journal of Comparative Pathology 115: 317-26.

De Luca, C., Picardo, M., Breathnach, A. e Passi, S. (1996) Lipoperoxidase activity of *Pityrosporum*: characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. Experimental Dermatology 5: 49-56.

DeBoer, D.J. e Hillier, A. (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. Veterinary Immunology and immunopathology 81: 271-6

Draize, J.H. The determination of the pH of the skin of man and common laboratory animals. Journal of Investigative Dermatology 1942; 5: 77-85.

Duarte, E.P., Melo, M.M., Hahn, R.C., Hamdan, J.S. (1999) Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. Medical Mycology 37: 159-162.

Dufait, R. (1983) *Pityrosporon canis* as the cause of canine chronic dermatitis. *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 78: 1055-1057.

Edwards, J.E., Nozawa, Y. e Ghannoum, M.A. (1995) Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 63:1993-1998.

Eichstedt, E., (1846) Pilzbildung in der *Pityriasis versicolor*. *Frörig Neue Notizen aus dem Gebeite der Naturkunde Heilkinde* 39: 270-270.

Farver, K., Morris, D.O., Shofer, F. e Esch, B. (2005) Humoral measurement of type-1 hypersensitivity reactions to a Commercial *Malassezia* allergen. *Veterinary Dermatology* 16: 261-268.

Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. E Picco, F. (2010) A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology* 21: 23-31.

Fearfield, L.A., Rowe, A., Francis, N., Bunker, C.B. e Staughton, R.C. (1999) Itchy folliculitis and human immunodeficiency virus infection: clinicopathological and immunological features, pathogenesis and treatment. *British Journal of Dermatology* 141: 3-11.

Forstrom, L., Goldstyne, M. E. e Winkelmann, R. K. (1975) IgE in human eccrine sweat. *Journal of Investigative Dermatology* 64:156-157.

Fraser, G. (1961) *Pityrosporum pachydermatis* weidman of canine origin. *Transactions of the British Mycological Society* 44: 441-8.

Fraser, M.A., McNeil, P.E. e Gettinby, G. (2004) Examination of serum total IgG1 concentration in atopic and non-atopic dogs. *Journal of Small Animal Practice* 45: 186–190.

Gedek, B., Brutzel, K., Gerlach, R., Netzer, F., Rocken, H., Unger, H. e Symoens, J. (1979) The role of *Pityrosporum pachydermatis* in otitis externa of dogs: evaluation of a treatment with miconazole. *Veterinary Record* 104: 138–40.

Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipase in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology review* 13:122-143.

Girão, M.D., Prado, M.R., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Monteiro, A.J., Sidrim, J.J.C. e Rocha, M.F.G. (2006) *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: a comparative analysis. *The veterinary journal* 172: 544-8.

Gross, T.L, Ihrke, P.J., Walder, E.J. e Affolter, V.K. (2005) *Skin disease of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis* 2th Ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Guaguère, E. e Prélaud, P. (1996) Étude rétrospective de 54 cas de dermite a *Malassezia pachydermatis* chez le chien: resultats epidemiologiques, cliniques, cytologiques et histopathologiques. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie* 31, 309–23.

Gueho, E. e Guillot, J. (1999) Comments on *Malassezia* species from dogs and cats. *Mycoses* 42: 673–4.

Guého, E., Simmons, R., Pruitt, W., Meyer, S. e Ahearn, D. (1987) Association of *Malassezia pachydermatis* with systemic infections of humans. *Journal of Clinical Microbiology* 25:1789-90.

Guillot, J. e Bond, R. (1999) *Malassezia pachydermatis*: a review. Medical Mycology 37: 295–306.

Guillot, J., Bensignor, E., Jankowski, E., Seewald, W., Chermette, R. e Steffan, J. (2003) Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population size on the skin of basset hounds. Veterinary Dermatology 14: 153-7.

Gustafson, B.A. (1955) Otitis externa in the dog. A bacteriological and experimental study. Thesis. Royal Veterinary College: Stockholm.

Habibah, A., Catchpole, B. e Bond, R. (2005) Canine serum immunoreactivity to *M. pachydermatis* in vitro is influenced by the phase of yeast growth. Veterinary Dermatology 16:147–152.

Hanel, H., I. Menzel, and H. Holzman. (1988) High phospholipase A activity of *Candida albicans* isolated from intestine psoriatic patients. Mycoses 31: 451–453.

Hay, R. (1992) Fungi and fungal infections of the skin. In: The Skin Microflora and Microbial Skin Diseases. Ed W. C. Noble. Cambridge University Press, Cambridge 232-263.

Helm, K.F. e Lookingbill, D.P. (1993) *Pityrosporum* folliculitis and severe pruritus in two patients with Hodgkin_s disease. Arch Dermatol 129: 130–1.

Hillier, A. e DeBoer, D.J. (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. Veterinary immunology and immunopathology 81: 289-304.

Ingham, E., G., Gowland, R. M., Ward, Holland, K.T. e Cunliffe, W.J. (1987) Antibodies to *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* exocellular enzymes in the normal population at various ages and in patients with acne vulgaris. *British Journal of Dermatology* 116:805–812.

Ishiguro, Y., Kato, K. e Ito, T. (1981) Sensitive solid phase enzyme immunoassay for human IgA, secretory IgA and secretory component. *Clinica Chimica Acta* 116:237–243.

Jasmin, P., Schroeder, H., Briggs, M., Last, R. e Sanquer, A. (2003) Assessment of the efficacy of a 3% chlorhexidine shampoo in the control of elevated cutaneous *Malassezia* populations and associated clinical signs (*Malassezia dermatitis*) in dogs. *Proceedings of the 19th Annual Congress of the ESVD ECVD, Tenerife*, 170.

Jesus, F.P., Lautert, C., Zanette, R.A., Mahl, D.L., Azevedo, M.I., Machado, M.L., Dutra, V., Botton, S.A., Alves, S.H. e Santurio, J.M. (2011) In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Veterinary Microbiology* 152:161–164.

Johansson, C., Eshaghi, H., Linder, M.T., Jakobson, E. e Scheynius, A. (2002) Positive atopy patch test reaction to *Malassezia furfur* in atopic dermatitis correlates with a T helper 2-like peripheral blood mononuclear cell response. *Journal of Investigative Dermatology* 118: 1044–51.

Johansson, C., Sandstrom, M.H., Bartosik, J., Särnhult, T., Christiansen, J., Zargari, A., Bäck, O., Wahlgren, C.F., Faergemann, J., Scheynius, A. e Tengvall Linder M. (2003) Atopy patch test reactions to *Malassezia* allergens differentiate subgroups of atopic dermatitis patients. *British Journal of Dermatology* 148: 479-488.

Kaneko, T., Makimura, K., Abe, M., Shiota, R., Nakamura, Y. Kano, R., Hasegawa, A. Sugita, T., Shibuya, S., Watanabe, S., Yamaguchi, H., Abe, S. e Okamura, N. (2007) Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* Species Journal of Clinical Microbiology 45: 3737–3742.

Kennis, R.A., Rosser, E.J., Olivier, N.B. e Walker, R.W. (1996) Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 208: 1048–51.

Kieffer, M., Bergbrant, I.M., Faergemann, J., Jemec, G.B., Ottevanger, V., Stahl Skov, P. e Svejgaard, E. (1990) Immune reactions to *Pityrosporum ovale* in adult patients with atopic and seborrheic dermatitis. Journal of the American Academy of Dermatology 22: 739–42.

Kim, H.J., Kim, E.T., Lim, C.Y., Park, C., Kang, B.T., Kim, J.W., Yoo, J.H. e Park, H.M. (2010) The immunoglobulin G response to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic and non-atopic dogs Canadian Veterinary Journal.

Kim, T.Y., Jang, I.G., Park, Y.M., Kim, H.O. e Kim, C.W. (1999) Head and neck dermatitis: the role of *Malassezia furfur*, topical steroid use and environmental factors in its causation. Clinical and Experimental Dermatology 24: 226–31.

Klotz, S. A. (1989) *Malassezia furfur*. Infectious Disease. Clinics of North America 3: 53-64.

Koranda, F. C., Dehmel, E.A., Kahn, G. e Penn, I. (1974) Cutaneous complications in immunosuppressed renal homograft recipients. Journal of the American Medical Association 229:419–424.

Kroger, S., Neuber, K., Gruseck, E., Ring, J., Abeck, D. (1995) *Pityrosporum ovale* extracts increase interleukin-4, interleukin-10 and IgE synthesis in patients with atopic eczema. Acta Dermato-Venereologica 75: 357–60.

Kumar, A., Singh, K. e Sharma, A., (2002) Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dogs ears. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 57:145–148.

Lian, T. e Halliwell, E.W. (1998) Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 203–23.

Lloyd, D.H. e Lamport, A.I. (1999) Activity of chlorhexidine shampoos in vitro against *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. *The Veterinary Record* 144: 536- 537.

Lloyd, D.H. e Lamport, A.T. (2000) Antimicrobial Activity in vitro of Shampoos Containing Chlorhexidine and Miconazole Combined, and Chlorhexidine Alone. 4th World Congress of Veterinary Dermatology *San Francisco, 31/08/00*.

Machado, M.L.S, Ferreiro, L., Ferreira, R.R., Corbellini, L.G., Deville, M., Berthelemy, M. e Guillot, J. (2011) *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Veterinary Dermatology*. 22: 46-52.

Machado, M.L.S., Appelt, C.E., Ferreiro, L. e Guillot, J. (2003) Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em canes e gatos.. *Clinica Veterinaria* 44: 27–34.

Mancianti, F., Rum, A., Tardoni, S. e Corazza, M. (2000) Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. isolates. *Mycopathologia* 149:131–135.

Marcon, M.J. e Powell, D.A. (1992) Human infections due to *Malassezia* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 5:101–19.

Marcon, M.J., Durrell, D.E., Powell, D.A. e Buesching, W.J. (1987) In vitro activity of systemic antifungal agents against *Malassezia furfur*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31: 951–3.

Mason, I.S., Mason, K.V. e Lloyd, D.H. (1996) Review article. A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* e *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Dermatology* 7:119-132.

Mason, K.V. e Stewart, L.J. (1993) *Malassezia* and canine dermatitis. In: Ihrke PJ, et al, *Advances in veterinary dermatology II*, New York: Pergamon Press, p399.

Masuda, A., Sukegawa, T., Mizumoto, N., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K. e Baba, E. (2000) Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. *Journal of veterinary medical science* 62: 1177-82.

Masuda, A., Sukegawa, T., Tani, H., Miyamoto, T., Sasai, K., Morikawa, Y. e Baba, E. (2001) Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. *Journal of veterinary medical science* 63: 667-9.

Mauldin, E.A., Scott, D.W., Miller, W.H. e Smith, C.A. (1997) *Malassezia* dermatitis in the dog: a retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990–95). *Vet Dermatol* 8, 191–202.

Mayer, U.K., Glos, K., Schmid, M, Power, H.T., Bettenay, S.V. e Mueller, R.S. (2008) Adverse effects of ketoconazole in dogs--a retrospective study. *Veterinary Dermatology* 19:199-208.

Maynard, L., Rème C. A. e Viaud, S. (2011) Comparison of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled trial. *Journal of Small Animal Practice* 52: 566–572.

Midgley, G., Gueho, E. e Guillot, J. (1998) Disease caused by *Malassezia* species, p. 201–211. In L. Ajello and R. J. Hay (ed.), *Topley & Wilson's microbiology and microbial infection*, vol 4. Arnold, London, United Kingdom.

Midreuil, F., Guillot, J., Guého, E., Renaud, F., Mallié M. e Bastide, J.M. Genetic diversity in the yeast species *Malassezia pachydermatis* analysed by multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal of systematic Bacteriology* 49: 1287-94.

Mittag, H. (1995) Fine structural investigation of *Malassezia furfur*. II. The envelope of the yeast cells. *Mycoses* 38: 13-21.

Moretti, A., Boncio, L., Posteraro, B., Mechelli, L., Balducci, M., Fadda, G., La Sorda M., Di Chio, M., Grelloni, V. e Agnetti, F. (2006) Co-cutaneous infection in a dog: PCR-reverse identification of *Candida tropicalis* on skin biopsy. *Journal de Mycologie Médicale* 16: 30-6.

Moretti, A., Posteraro B., Boncio, L., Mechelli, L., De Gasperis, E., Agnetti, F. e Raspa, M. (2004) Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Revista Iberoamericana de Micologia* 21: 139-42.

Morris, D.O. e DeBoer, D.J. (2003) Evaluation of serum obtained from atopic dogs with dermatitis attributable to *Malassezia pachydermatis* for passive transfer of immediate hypersensitivity to that organism. *American Journal of Veterinary Research* 64: 262-6.

Morris, D.O., Clayton, D.J., Drobatz, K.J. e Felsburg, P.J. (2002) Response to *Malassezia pachydermatis* by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *American Journal of Veterinary Research* 63: 358-62.

Morris, D.O., Olivier, N.B. e Rosser, E.J. (1998) Type-1 hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic dogs. *American Journal of Veterinary Research* 59: 836-41.

Morrison, V.A. e Weisdorf, D. (2000) The spectrum of *Malassezia* infections in the bone marrow transplant population. *Bone Marrow Transplant* 26: 645–8.

Mueller, R.S., Bettenay, S.V. e Shipstone, M. (2002) Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. *Veterinary Record* 150: 728-30.

Nardoni, S., Dini, M., Taccini, F. e Mancianti, F. (2007) Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Veterinary microbiology* 122: 172-7.

Nardoni, S., Mancianti, F., Corazza, M. e Rum, A. (2004) Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. *Mycopathology* 157: 383–8.

Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Picardo M., Mercantini, R. e Breathnach, A.S. (1986) Lipoxygenase activity of *Pityrosporum* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 87: 108–12.

Negre, A., Bensignor, E. e Guillot, J. (2008) Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary dermatology* 20: 1-12.

Nett, C.S., Reichler, I., Grest, P., Hauser, B. e Reusch, C.E. (2001) Case report. Epidermal dysplasia and *Malassezia* infection in two West Highland White Terrier siblings: an inherited skin disorder or reaction to severe *Malassezia* infection? *Veterinary Dermatology* 12: 285–290.

Nijima, M., Kano, R., Nagata, M., Hasegawa, A. e Kamata, H. (2011) An azole resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Microbiology* 149: 288–290.

Nishimura, K., Asada, Y., Tanaka, S. e Watanabe, S. (1991) Ultrastructure of budding process of *Malassezia pachydermatis*. Journal of Medical and Veterinary Mycology 29: 387-93.

Nissen, D., Petersen, L.J., Esch, R., Svejgaard, E., Skov, P.S., Poulsen, L.K. e Nolte, H. (1998) IgE-sensitization to cellular and culture filtrates of fungal extracts in patients with atopic dermatitis. Annals of Allergy, Asthma, and Immunology 81: 247-55.

Nordvall, S.L., Lindgren, L., Johansson, S.G., Johansson, S. e Petrini, B. (1992) IgE antibodies to *Pityrosporum orbiculare* and *Staphylococcus aureus* in patients with very high serum total IgE. Clinical and Experimental Allergy 22: 756-61.

Nuttall, T.J. e Halliwell, R.E.W. (2001) Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. Veterinary dermatology 12: 327-32.

Nuttall, T.J., Chen, T.A. e Hill, P.B. (2003) Peripheral blood mononuclear cell responses to a crude *Malassezia pachydermatis* extract in dogs with atopic dermatitis and healthy dogs. In: British Small Animal Veterinary Association Congress, 2003 Scientific Proceedings. Birmingham: British Small Animal Veterinary Association 583.

Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T. e Prélaud P. (2010) Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. Veterinary Dermatology 21: 1365-3164.

Olivry, T., Marsella, R., Iwasaki, T. e Mueller, R. (2007) The International Task force on Canine Atopic Dermatitis. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. Veterinary dermatology 18: 78-86.

Olivry, T., Moore, P.F., Affolter, V.K. e Naydan, D.K. (1996) Langerhans' cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. Archives of Dermatological Research 288: 579–85.

Omodo-Eluk, A.J., Baker, K.P. e Fuller, H. (2003) Comparison of Two Sampling Techniques for the Detection of *Malassezia pachydermatis* on the Skin of Dogs with Chronic Dermatitis. The veterinary Journal 165: 119-24.

Page, C. O., e Remington, J.S. (1967) Immunologic studies in normal human sweat. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 69: 634–50.

Panja, G. (1927) The *Malassezia* of the skin, their cultivation, morphology and species. Far Eastern Association of Tropical Medicine: Transactions of the 7th Congress 2: 442–446.

Peng, Z., Arthur, G., Rector, E.S., Kierek-Jaszczuk, D., Simons, F.E. e Becker, A.B. (1997) Heterogenicity of polyclonal IgE characterized by different charge, affinity to protein A and antigenicity. Journal of Allergy and Clinical Immunology 100: 86–95.

Pinchbeck, L.R., Hillier, A., Kowalski, J.J. e Kwochka, K.W. (2002) Comparison of pulse administration versus once daily administration of itraconazole for the treatment of *Malassezia pachydermatis* dermatitis and otitis in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 12: 1807–12.

Plant, J.D., Rosenkrantz, W.S. e Griffin, C.E. (1992) Factors associated with a prevalence of high *Malassezia pachydermatis* members on dog skin. Journal of American Veterinary Medical association 201: 879-885.

Price, M. F., Wilkinson, I. D. e Gentry, L.O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7– 14.

Raabe, P., Mayser, P. e Weiss, R. (1998) Demonstration of *Malassezia furfur* and *M. sympodialis* together with *M. pachydermatis* in veterinary specimens. *Mycoses* 41: 493–500.

Redline, R.W. e Dahms, B.B. (1981) *Malassezia* pulmonary vasculitis in an infant on long-term intralipid therapy. *New England Journal of Medicine* 305: 1395–8.

Rhie, S., Turcios, R., Buckley, H., Suh, B. (2000) Clinical features and treatment of *Malassezia* folliculitis with fluconazole in orthotopic heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 19: 215–9.

Richet, H.M., McNeil, M.M., Edwards, M.C. e Jarvis, W.R. (1989) Cluster of *Malassezia furfur* pulmonary infections in infants in a neonatal intensive-care unit. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1197–200.

Riciputo, R. M., Oliveri, S., Micali, G. e Sapuppo, A. (1966) Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses* 39: 233–235.

Rokugo, M., Tagami, H., Usuba, Y. e Tomita, Y. (1990) Contact sensitivity to *Pityrosporum ovale* in patients with atopic dermatitis. *Archives of Dermatology* 126: 627–32.

Rosales, M.S., Marsella, S., Kunkle, G., Harris B.L., Nicklin C.F. e Lopez, J. (2005) Comparison of the clinical efficacy of oral terbinafine and ketoconazole combined with cephalexin in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs – a pilot study. *Veterinary dermatology* 16: 171-6.

Rosenberg, E.W., Belew, P. e Bale, G. (1980) Effect of topical application of heavy suspension of killed *Malassezia ovalis* on rabbit skin. *Mycopathologica* 72: 147-54.

Roy, W.E. (1954) Role of the sweat glands in eczema of dogs. A preliminary report. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 124: 5 1-4.

Sai, J. P., Madhavi, S. L. e Satish, K. K. (2006) Therapeutic studies on seborrheic dermatitis in dogs associated with *Malassezia pachydermatis*. *Indian Veterinary Journal* 83: 162-164.

Salkin, I.F. e Gordon, M.A. (1977) Polymorphism of *Malassezia furfur*. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 471-5.

Savolainen, J., Lintu, P., Kosonen, J., Kortekangas-Savolainen, O., Viander, M., Pène, J., Kalimo, K., Terho, E.O. e Bousquet, J. (2001) *Pityrosporum* and *Candida* specific and non-specific humoral, cellular and cytokine responses in atopic dermatitis patients. *Clinical and Experimental Allergy* 31: 125-34.

Scheynius, A., Johansson, C., Buentke, E., Zargari, A. e Linder, M.T. (2002) Atopic eczema/dermatitis syndrome and *Malassezia*. *International Archives of Allergy and Immunology* 127: 161-9.

Scott D.W.; Miller W.H. e Griffin C.E. (2001). *Small Animal Dermatology*. 6th Ed Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Segal, R., Shmueli, D., Yussim, A., Sandbank, M., Alteras, I. e Shapira, Z. (1989) Renal transplant incidence of superficial fungal infection as related to immunosuppression therapy. *Transplantation Proceedings* 21:2114-2116.

Smith, K. J., Skelton, H. G., Yeager, J., Ledsky, R., McCarthy, W., Baxter, D. e Wagner, K. F. (1994) Cutaneous findings in HIV-1 positive patients: a 42 month prospective study. *Journal of American Academy of Dermatology* 31:746-754.

Sohnle, P.G. e Collins-Lech, C. (1983) Activation of complement by *Pityrosporum orbiculare*. Journal of Investigative Dermatology 80: 93–7.

Sohnle, P.G. e Kirkpatrick, C.H. (1978) Epidermal proliferation in the defense against experimental cutaneous candidiasis. Journal of Investigative Dermatology 70:130-3.

Sohnle, P.G., Collins-Lech, C., Huhta, K.E. (1983) Class-specific antibodies in young and aged humans against organisms producing superficial fungal infections. British Journal of Dermatology 108: 69–76.

Sugita, T., Tajima, M., Ito, T., Saito, M., Tsuboi, R. e Nishikawa, A. (2005) Antifungal Activities of Tacrolimus and Azole Agents against the Eleven Currently Accepted *Malassezia* Species Journal of clinical Microbiology 43: 2824–2829.

Sugita, T., Takashima, M., Shinoda, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H. e Nishikawa, A. (2002) New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. Journal of Clinical Microbiology 40:1363-7.

Surmont, I., Gavilanes, A., Vandepitte, J., Devlieger, H., Eggermontet, E. (1989) *Malassezia furfur* fungaemia in infants receiving intravenous lipid emulsions. A rarity or just underestimated? Journal of Pediatrics 148: 435–8.

Swift, J.A. e Dunbar, S.F. (1965) Ultrastructure of *Pityrosporum ovale* and *Pityrosporum canis*. Nature 206: 1174– 5.

Takahashi, Shimosuma, M., Epstein, W. L. e Fukuyama, E. (1989) Candidacidal activities of proteins partially purified from rat epidermis. Infection and Immunity 57:186–190.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596–1599.

Tengvall Linder, M., Johansson, C., Bengtsson, A., Holm, L., Härfast, B. e Scheynius, A. (1998) *Pityrosporum orbiculare*-reactive T-cell lines in atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Scandinavian Journal of Immunology* 47: 152–8.

Tengvall Linder, M., Johansson, C., Scheynius, A. e Wahlgren, C. (2000) Positive atopy patch test reactions to *Pityrosporum orbiculare* in atopic dermatitis patients. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 122–31.

Tengvall Linder, M., Johansson, C., Zargari, A. et al. (1996) Detection of *Pityrosporum orbiculare* reactive T cells from skin and blood in atopic dermatitis and characterization of their cytokine profiles. *Clinical and Experimental Allergy* 26: 1286–97.

Tragiannidis, A., Bisping, G., Koehler, G. e Grol, A.H. (2010) Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses* 53: 187-95.

Valli, J.L., Williamson, A, Sharif, S., Rice, J e Shewen, P.E. (2010) In vitro cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells from healthy dogs to distemper virus, *Malassezia* and *Toxocara*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134: 218–229.

Van Belkum, A., Boekhout, T., Bosboom, R. (1994) Monitoring spread of *Malassezia* infections in a neonatal intensive care unit by PCR-mediated genetic typing. *J Clin Microbiol* 32:2528-32.

Velegraki, A., Alexopoulos, E.C., Kritikou, S. e Gaitanis, G., (2004). Use of fatty acid RPMI 1640 media for testing susceptibilities of eight *Malassezia* species to the new triazole posaconazole and to six established antifungal agents by a modified NCCLS M27-A2 microdilution method and Etest. *Journal of Clinical Microbiology* 242: 3589–3593.

Vermitsky, J.P. e Edlind, T.D. (2004) Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapeutics* 48: 3773–3781.

Vidal, C., Girard, P. M., Domp martin, D., Bosson, J. L., Met, C., Gros Lambert, P., Coulaud, J. P. e Amblard, P. (1990) Seborrheic dermatitis and HIV infection. *Journal of American Academy of Dermatology* 23:1106–1110.

Von Tschärner, C., Wyder, M., Busato, A. et al. (1999) Proliferation characteristics of canine keratinocyte cultures infected with *Malassezia pachydermatis*. In: *Proceedings of the 15th Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology/American College of Veterinary Dermatology*. Hawaii: American Academy of Veterinary Dermatology/American College of Veterinary Dermatology 107–8.

Weidman, F.D. (1925) Exfoliative dermatitis in the Indian Rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) with description of a new yeast species, *Pityrosporum pachydermatis*. *Report of the Laboratory Museum Comparative Pathology Zoological Society*: 1925. Philadelphia: Comparative Pathology Zoological Society 36-45.

Welbel, S.F., McNeil, M., Pramanik, A., Silberman, R., Oberle, A.D. e Midgley, G. (1994) Nosocomial *Malassezia pachydermatis* bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 13: 104–8.

Wessels, M.W., Doekes, G., Ieperen-Van Kijk, A.G., Koers, W.J. e Young, E. (1991) IgE antibodies to *Pityrosporum ovale* in atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 125: 227–32.

Xu, J., Saunders, C.W., Hu, P., Grant, R.A., Boekhout, T., Kuramae, E.E., Kronstad, J.W., Deangelis, Y.M., Reeder, N.L., Johnstone, K.R., Leland, M., Fieno, A.M., Begley, W.M., Sun, Y., Lacey, M.P., Chaudhary, T., Keough, T., Chu, L., Sears, R., Yuan, B. e Dawson, T.L. (2007) Dandruff-associated *Malassezia* genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18730-5.

Yager, J.A. (1993) The skin as an immune organ. In: Ihrke PJ, Mason IS, White SD eds. *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 2. Oxford: Pergamon Press, 3–31.

Yohn, J.J., Lucas, J. e Camisa, C. (1985) *Malassezia* folliculitis in immunocompromised patients. *Cutis* 35: 536–8.

Young, E., Koers, W.J. e Berrens, L. (1989) Intracutaneous tests with *Pityrosporon* extract in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica Supplement (Stockh)* 144: 122–4.

Yurayart, C., Chindamporn, A., Suradhat, S., Tummaruk P., Kajiwarara S. e Prapasarakul, N. (2011) Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. *Veterinary Microbiology* 148: 356-62.