Identification of *Malassezia* species using PCR-RFLP molecular method in the patients with pityriasis versicolor

Hosseini Bafghi M., PhD[1], Mozafari N.A., PhD[2], Fata A.M. PhD[3,4], Naseri A., PhD[3], Zarrinfar H., PhD[5]
1. Islamic Azad University, Tehran science and research branch, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Cutaneous Leishmaniasis Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5. Allergy research center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author),Tel:+98-51-38403141, Zarrinfarh@mums.ac.ir

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

ABSTRACT

Background and Aim: *Malassezia* yeast can become pathogenic under certain conditions in humans. *Malassezia* has various species which can cause a number of skin diseases, such as pityriasis versicolor (tinea versicolor), seborrheic dermatitis and folliculitis and even systemic infections. In the present study, *Malassezia* species isolated from the patients with pityriasis versicolor were identified by PCR-PFLP molecular method.

Material and Methods: In this study, the scraping specimens of the trunk and scalp of the patients with pityriasis versicolor were cultured on Dixon agar medium. Finally, one-hundred *Malassezia* colonies were obtained. The genomic DNA was extracted by phenol–chloroform method and then was studied by use of PCR-PFLP molecular method. D1-D2 segment in the area of 26srDNA of ITS gene was proliferated by specific primers and then the PCR products were exposed to *CfoI* restrictive enzyme.

Results: Among 100 *Malassezia* colonies, the most common *Malassezia* species were; *M. globosa* (44%), *M. globosa*/*M. restricta* (27%), *M. restricta* (11%), *M. sympodialis* (7%), *M. sympodialis*/*M. restricta* (4%), *M. globosa*/*M. restricta/M. furfur* (1%), *M. sympodialis*/*M. restricta/ M. globosa* (1%) and unknown species (5%).

Conclusion: The dominant species isolated from patients with pityriasis versicolor were *M. globosa*, *M. restricta* and *M. sympodialis*, respectively. Thirty-three percent of the specimens had more than one *Malassezia* species. Therefore, rapid PCR-RFLP method is recommended for identification of *Malassezia* species in epidemiological studies and production of more effective medicines.

Key words: *Malassezia*; Pityriasis versicolor; PCR-RFLP.

Received: Oct 1, 2016 **Accepted:** Feb 11, 2017

شناسایی گونه‌های مالاســزیا در مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر با روش مولکولی PCR-RFLP

سید مهدی حسینی بافقی[۱]، نور امیر مظفری[۲]، عبدالمجید فتی[۳،۴]، علی ناصری[۳]، حسین زرین‌فر[۵]

۱. دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، رشته میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.

۲. دکترای تخصصی، میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران.

۳.گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد.

۴. استاد، مرکز تحقیقات بیماری ها پوست و سالک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد.

۵. استادیار مرکز تحقیقات آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت :۳۸۴۰۳۱۴۱-۰۵۱، Zarrinfarh@mums.ac.ir

چکیــده

زمینه و هدف: مالاسزیاها، مخمرهایی هستند که در شرایط خاص به عواملی بیماری زا در انسان تبدیل می‌شوند. مالاسزیاها دارای گونه های مختلفی بوده و می توانند بیماری هایی نظیر پیتیریازیس ورسیکالر(تینه آورسیکالر)، فولیکولیت مالاسزیایی، درماتیت سبوروئیک و حتی عفونت های سیستمیک را ایجاد کنند. در مطالعه حاضر، مالاسزیاهای جدا شده از مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر با روش مولکولی شناسایی شدند.

روش بررسی: در این مطالعه، پوسته های سر و بدن مبتلایان مشکوک به پیتیریازیس ورسیکالر بر روی محیط کشت دیکسون آگار کشت داده شده و در نهایت ۱۰۰ کلنی مالاسزیایی بدست آمد. ژنوم کلنی های مالاسزیاها پس از استخراج توسط روش فنل کلروفرم، بر اساس روش مولکولی PCR-PFLP مورد مطالعه قرار گرفتند. در این روش، قطعه D1-D2 در ناحیه‌ی 26S rDNA از ژن ITS توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید و توسط آنزیم محدودالاثر *CfoI*، قطعات با الگوی های مشخص برای هر گونه‌ی مالاسزیا به دست آمد.

یافته ها: ایزوله های مالاسزیا شناسایی شده در نمونه های بالینی به ترتیب دارای ۴۴٪ مالاسزیا گلوبوزا،۲۷٪ مالاسزیا گلوبوزا/ مالاسزیا رستریکتا، ۱۱٪ مالاسزیا رستریکتا، ۷٪ مالاسزیا سیمپودیالیسپ ، ۴٪ مالاسزیا سیمپودیالیس/ مالاسزیا رستریکتا، ۱٪ مالاسزیا فورفور/ مالاسزیا گلوبوزا/ مالاسزیا رستریکتا، ۱٪ مالاسزیا سیمپودیالیس/ مالاسزیا گلوبوزا/ مالاسزیا رستریکتا بودند. ۵٪ از گونه ها نیز بصورت ناشناخته باقی ماندند.

نتیجه گیری: گونه های غالب مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر، به ترتیب مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا سیمپودیالیس بودند. ۳۳ درصد از نمونه ها دارای بیش از یک گونه مالاسزیا بودند، اگر چه روش PCR-RFLP برای شناسایی اغلب گونه های مالاسزیا بود، ولی ۵٪ از ایزوله ها قابل شناسایی نبودند.

کلیــد واژه‌ها: مالاسزیا، پیتیریازیس ورسیکالر،PCR–RFLP

وصول مقاله:۹۵/۷/۱۰ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۱/۲ پذیرش:۹۵/۱۱/۲۳

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مقـدمه

گونه های مالاسزیا (*Malassezia* spp.) مخمّرهایی اغلب چربی‌دوست بوده که به طور فلور نرمال بر روی پوست اغلب انسان ها زندگی می‌کنند. ولی در عین حال می توانند در شرایط خاصی به فرم بیماریزا درآمده و ایجاد علائم بالینی خاصی را بنمایند (۱). این مخمّرها می توانند در قسمت های مختلف بدن ایجاد بیماری کنند (۲). مالاسزیاها معمولاً در قسمت هایی از بدن یافت می‌شوند که دارای مقادیر زیادی غدد چربی بوده و در حال حاضر شواهد نشان‌دهنده فراوانی بیشتر آن‌ها در پوست افراد بالغ می‌باشد. در مقابل، میزان کلنیزه شدن این مخمرها در کودکان نابالغ کم می‌باشد (۳). جنس مالاسزیا در رابطه با ایجاد بسیاری از بیماری‌هایی که بر روی پوست انسان تأثیر می‌گذارند از جمله پیتیریازیس ورسیکالر (تینه آ ورسیکالر)، فولیکولیت مالاسزیایی، درماتیت سبورئیک، شوره‌ی سر، آکنه استروئیدی، درماتیت آتوپیک و پسوریازیس شناخته شده‌اند (۶-۴). فولیکولیت مالاسزیایی ممکن است با آکنه اشتباه شود و بالعکس ،به‌طوری‌که برخی بیماران ممکن است بعد از مصرف تتراسایکلین برای درمان فولیکولیت مالاسزیایی نشانه‌های آکنه را بروز بدهند (۷).

تاکنون ۱۴ گونه از جنس مالاسزیا شناخته شده‌اند که عبارت‌اند از:

M. restricta, M .furfur, M. pachydermatis, M. sympodialis, M .globosa, M .obtusa, M. japanica, M. nana M. sloofiae. M. caprae, M. equina, M. yamatoensis, M. dermatis M. Cuniculi (۸-۱۱) .

در روش‌های فیزیولوژیک، نوع مواد شیمیایی و ترکیبات محیط کشت باعث محدودیت در استفاده از روش‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک جهت تشخیص گونه‌های مالاسزیا می شود ولی با این حال در آزمایشگاه هایی که هنوز امکان استفاده از روش های مولکولی وجود ندارد، هنوز در حال انجام است (۱۲). از این رو استفاده از روش‌های با حساسیت و ویژگی مناسب و با تکرار پذیری بالا به منظور تشخیص صحیح این مخمرها ضروری می‌باشد و لذا روش‌های مولکولی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند.

هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین هویت گونه‌های مالاسزیا جدا شده از سر و بدن مبتلایان به بیماری پیتیریازیس ورسیکالر در منطقه شاندیز-مشهد توسط روش مولکولی PCR-RFLP می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ کلنی مالاسزیا از نمونه های بالینی شامل پوسته های سر و بدن از مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر در شهر شاندیز و مشهد (بیمارستان قائم (عج)) در سال ۹۳-۹۲ و بصورت تصادفی ساده بدست آمد. این نمونه گیری در فصل بهار و تابستان انجام گردید. نمونه برداری به روش تراشیدن پوسته‌ها و توسط اسکالپل از بیماران دارای علائم و مشکوک به تینه آ ورسیکالر انجام گرفت. در شهر شاندیز این بیماران شامل مراجعه کنندگان به مرکز بهداشت و نیز کارکنان مجموعه پدیده و در مشهد مراجعه کنندگان به بیمارستان قائم (عج) بودند. هر نمونه (پوسته های گرفته شده) به دو قسمت تقسیم شد: یک قسمت با استفاده از هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۲۰-۱۰ درصد شفاف شده و در مورد پوسته‌ها و شوره‌های سر، پس از رنگ‌آمیزی با رنگ بلودومتیلن، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. بخش دیگری از نمونه‌ها بر روی محیط کشت دیکسون آگار (Quelab) کشت داده شدند.

جهت کشت نمونه‌ها بر روی این محیط، نمونه‌ها (پوسته‌ها) به وسیله آنس استریل و یا اسکالپل در چند نقطه از محیط کشت تلقیح شدند و سپس جهت ایجاد محیطی مرطوب، نمونه‌ها را در داخل یک کیسه پلاستیکی قرار داده و در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور نگهداری شدند، پلیت‌ها طی مدت دو هفته از نظر رشد و خصوصیات ماکروسکوپی کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفته و سپس،

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

کلنی‌ها برای استفاده جهت آزمایش مولکولی در داخل تیوب های ۱/۵ سی سی قرار گرفتند.

برای استخراج DNA کروموزومی از کلنی های رشد کرده، از روش فنل کلروفرم استفاده گردید (۱۳-۱۵). به همین منظور، حدود ۲۵۰ میکرولیتر گلاس بید را به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل و کلروفرم و مقداری از نمونه‌های مورد نظر (کلنی مخمری) را به آن افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و سپس مایع رویی را جدا کرده و به تیوب‌های جدید منتقل شدند. سپس به هر تیوب ۲۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول و ۲۵ میکرولیتر استات سدیم اضافه کرده و پس از ورتکس در فریز ۲۰- حداقل بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. تیوب ها سپس ۱۰دقیقه در دور ۱۰/۰۰۰ سانتریفیوژ شده و الکل را از روی رسوب حاصله خارج کرده و ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه به هر تیوب اضافه کرده و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰/۰۰۰سانتریفیوژ شدند. مجدداً مایع رویی را خارج کرده و حدود نیم ساعت جهت تبخیر کامل صبر کرده به طوری‌که هیچ قطره‌ای باقی نماند و آنگاه ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر (بسته به حجم قارچ اولیه با غلظت DNA مورد نیاز) تریس بافر $\frac{1}{100}$ مولار به هر تیوب اضافه شدند. ژنوم استخراج شده تا زمان انجام آزمون PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

در آزمون PCR از پرایمرهای تکثیر دهنده جایگاه 26S rDNA بصورت forward (5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA-3') و reverse (5'– ATTACGCCAGCATCCTAAG-3') استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد:

DNA template = 1 μL
Each Primer = 0.5 μM
D. W. = 10.5 μL
Premix = 12.5 μL

میزان مخلوط فوق بسته به تعداد نمونه‌ها و کنترل منفی محاسبه شده، داخل یخ (جهت پرهیز از اتصال پرایمرها به نواحی غیراختصاصی در دمای اتاق) تهیه و پس از اینکه به خوبی مخلوط گردید، حجم نهایی واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسید.

پس از تهیه تقسیم مواد واکنش، تیوب‌های PCR به دستگاه ترمال سایکلر منتقل و تحت برنامه حرارتی و زمانی زیر، عمل تقویت و تکثیر از نواحی ذکر شده به عمل آمد. برنامه PCR به‌صورت زیر بود:

Initial denaturation (تقلیب یا واسرشت سازی اولیه) 95ºC for 6'
Thermo-cycle file (تعداد سیکل های واکنش) 35 cycles of
Denaturation (تقلیب یا واسرشت سازی) 94ºC for 45"
Annealing: (چسبیدن پرایمرها) 55ºC for 60"
Extension: (تکثیر) 72ºC for 45"
Final extension (تکثیر تکمیلی) 72ºC for 7'
ϕ 4ºC

پس از پایان واکنش PCR، برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. آنگاه ژل در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه UV document و تحت اشعه‌ی ماوراءبنفش عکس‌برداری شد.

در مرحله‌ی نهایی از آنزیم محدودالاثر *CfoI* نوع Fast digest ساخت شرکت Fermentas جهت انجام آزمون RFLP استفاده گردید. بدین‌صورت که به تعداد محصولات PCR ای که می‌بایست تحت عمل هضم آنزیمی قرار می‌گرفتند، ابتدا Master mix تهیه شده و سپس به میزان مشخص و به تعداد نمونه های مربوطه به داخل تیوپ‌ها منتقل شدند. به طور خلاصه، ۲ میکرولیتر از محصول‌های PCR با ۲/۵ میکرولیتر بافر ویژه‌ی آنزیم و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر در تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری مخلوط و به مدت ۲ ساعت در حرارت ^{o}C ۳۷ قرار داده شدند.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

سپس تمام محصولات RFLP در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و داخل دستگاه UV document و تحت اشعه‌ی ماوراءبنفش عکس‌برداری گردید و در نهایت بر اساس نتایج سایر مقالات مرتبط، تشخیص گونه ها بر اساس وزن و تعداد باندهای ایجاد شده انجام گردید (۱۶و ۱۰). تحلیل داده ها با استفاده از فرمولهای آمار توصیفی انجام شد.

یافته ها

نمونه برداری از نواحی سر، صورت، گردن و لاله‌ی گوش افراد مشکوک مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر انجام شد که ۱۰۰ کلنی مثبت از بیماران مبتلا بدست آمد. نتایج PCR مالاسزیاهای جدا شده نشان دهنده اندازه باندهای حدود ۵۸۰ جفت باز بود و نتایج RFLP نیز بسته به گونه های مختلف دارای اندازه باندهای متفاوت بود. فراوانی گونه های شناسایی شده در هر یک از نمونه های بالینی در جدول شماره ۱ آمده است. در بین مبتلایان مورد بررسی، مالاسزیا گلوبوزا بالاترین درصد فراوانی (۴۴٪) و مالاسزیا سیمپودیالیس کمترین درصد فراوانی (۱٪) را داشتند (جدول ۱). در ۳۳ درصد از نمونه ها نیز بین دو تا سه گونه از مالاسزیاها بطور همزمان وجود داشتند. میزان فراوانی هر کدام از گونه ها به تنهایی، شامل مالاسزیا گلوبوزا ۷۳ مورد، مالاسزیا رستریکتا ۴۴ مورد، مالاسزیا سیمپودیالیس ۱۲ مورد و مالاسزیا فورفور ۱ مورد بودند.

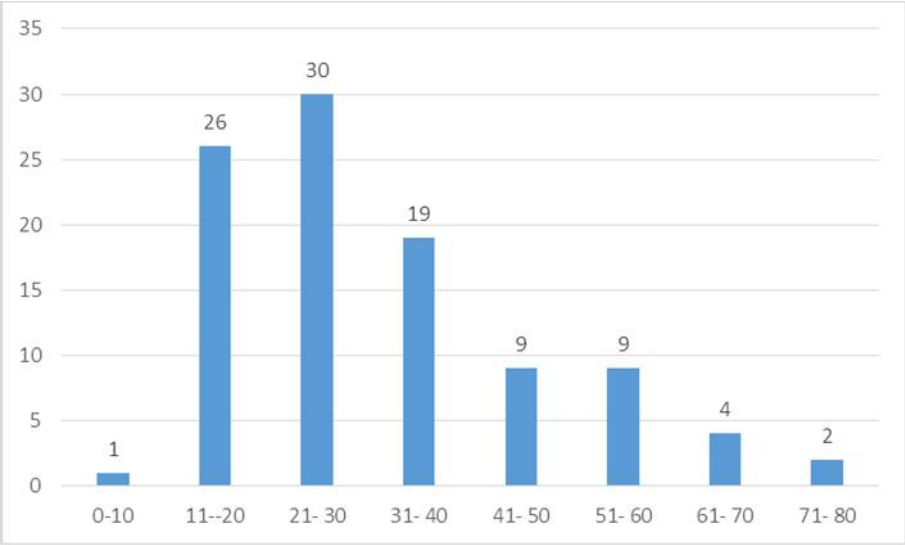
جدول ۱. توزیع فراوانی گونه های مالاسزیا در نمونه های (پوسته های) مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر در شهر مشهد

گونه های مالاسزیا	فراوانی گونه ها در نمونه های بالینی	فراوانی گونه ها در جنس مذکر	فراوانی گونه ها در جنس مونث
مالاسزیا گلوبوزا	۴۴	۳۲	۱۲
مالاسزیا رستریکا	۱۱	۷	۴
مالاسزیا سیمپودیالیس	۷	۵	۲
مخلوط گلوبوزا و رستریکتا	۲۷	۱۷	۱۰
مخلوط سیمپودیالیس و رستریکتا	۴	۱	۳
مخلوط فورفور وگلوبوزا و رستریکتا	۱	۰	۱
مخلوط سیمپودیالیس و گلوبوزا و رستریکتا	۱	۰	۱
گونه های ناشناخته	۵	۲	۳
جمع کل نمونه ها	۱۰۰	۶۴	۳۶

بیشترین نواحی بدن که قارچ مالاسزیا از آن جدا گردید، بترتیب شامل سر (۹۴ مورد)، لاله گوش (۲ مورد)، صورت-چانه (۲ مورد) و صورت-گونه (۲ مورد) بودند.

از نظر میزان فراوانی عفونت پیتیریازیس ورسیکالر در میان گروه‌های سنی مختلف، بیشترین مبتلایان در گروه‌های سنی ۳۰-۲۱ سال و ۲۰-۱۱ سال به ترتیب ۳۰ درصد و ۲۶ درصد مشاهده شد و گروه سنی ۴۰-۳۱ سال با ۱۹ درصد ابتلا، در رده بعدی قرار گرفت. کمترین میزان ابتلا به این عفونت در سنین کمتر از ۱۰ سال با ۱ درصد و نیز سنین بالاتر از ۷۰ سال با ۲ درصد بودند (نمودار ۱).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017



نمودار ۱. توزیع فراوانی گروه های سنی در مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر در شهر مشهد

بحث

در مطالعه حاضر، شناسایی و تعیین هویت گونه‌های مالاسزیا در سر و بدن مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر در منطقه شاندیز-مشهد توسط روش مولکولی PCR-RFLP انجام شد. با توجه به متفاوت بودن گونه ها در برخی مناطق و نیز حساسیت های مختلف دارویی در گونه های مختلف، شناسایی دقیق این عوامل می تواند دارای اهمیت اپیدمیولوژیک و درمانی باشد (۱۸و ۱۷).

در سال های گذشته ملاک طبقه‌بندی مخمرهای جنس مالاسزیا بر اساس شاخص‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک بوده است، ولی در سال های اخیر بر اساس معیارهای ژنوتیپی تاکنون ۱۴ گونه مالاسزیا توصیف شده است (۹). حساس بودن به تغییرات محیطی و کند رشد بودن برخی گونه‌های مالاسزیا مانند گلوبوزا، اوبتوزا و بخصوص رستریکتا، و از طرفی دیگر تشابه زیاد نتایج آزمایش‌های فیزیولوژیک و مشخصات مورفولوژیک بین برخی گونه‌های مالاسزیا مثل مالاسزیا فورفور، مالاسزیا سیمپودیالیس و اسلوفیه شناسایی این قارچ ها را از این طریق مشکل کرده است. همچنین وابستگی روش‌های فیزیولوژیک به عوامل مختلف باعث محدودیت در استفاده از روش‌های فیزیولوژیک و همچنین مورفولوژیک در جهت تشخیص گونه‌های مالاسزیا شده است. لذا ارائه روش‌های کاملاً حساس با تکرار پذیری بالا و نیاز به حداقل میزان نمونه به منظور تشخیص صحیح این مخمرها ضروری می‌باشد. لذا استفاده از روش‌های مولکولی مناسب تر بنظر می رسند. زیرا این روش‌ها دقیق، حساس و سریع بوده و برخلاف روش‌های فنوتیپی که بسیار تحت شرایط محیطی قرار می‌گیرند از تکرار پذیری بالاتری برخوردارند.

کمپلکس ژنی DNA ی ریبوزومی (rDNA) دارای بخش-های محافظت شده و متغیر است که بسته به اهداف تشخیصی می‌تواند برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها در حد جنس یا گونه به کار رود. این نواحی، جایگاه های مناسبی برای تعیین جایگاه تاکسونومیک بیشتر قارچ‌ها از جمله مالاسزیاها می-باشد (۸). از میان روش‌های مولکولی، روش PCR-RFLP توانایی تعیین گونه‌های مالاسزیا را با دقت مناسبی مطابق با تاکسونومی جدید دارد که این مسئله نیز با استرین‌های استاندارد مالاسزیا اثبات شده است (۱۹).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

نتایج به دست‌آمده از روش PCR-RFLP از وضعیت قابل قبولی در مقایسه با نتایج تعیین توالی بوده است (۲۱و ۲۰). این روش قابل استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیک و شناسایی دقیق گونه ها قبل از شروع به درمان نیز می‌باشد. در تحقیق حاضر، از میان ۱۰۰ ایزوله بدست آمده از مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر، گونه های شناسایی شده شامل ۴۴ درصد مالاسزیا گلوبوزا، ۱۱ درصد مالاسزیا رستریکتا، ۷ درصد مالاسزیا سیمپودیالیس و یک درصد مالاسزیا فورفور بودند که برخی از ایزوله های بدست آمده از نمونه های بالینی دارای دو یا سه گونه (Mixed) از مالاسزیاها بودند. این نتایج نشان می‌دهد که مانند اکثر مطالعات انجام شده در دیگر نقاط دنیا، مالاسزیا گلوبوزا گونه‌ی غالب در این بیماران می‌باشد (۱۶و ۱۰).

در مطالعه مشابهی که توسط Sugita و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شد، مالاسزیاهای پوست را در موارد درماتیت اتوپیک توسط روش PCR- RFLP مورد بررسی قرار دادند که گونه‌های مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا رستریکتا ۸۰٪ موارد را تشکیل می‌دادند (۹). با این حال، در مطالعه حاضر، ۵ درصد از مالاسزیاهایی که از نمونه های بالینی جدا شدند با این روش قابل شناسایی نبودند. لذا از محدودیت هایی که تکنیک حاضر با استفاده از آنزیم *CfoI* می توان بیان کرد، عدم شناسایی کامل تمام گونه های بیماری زا می باشد. لذا شاید در این موارد استفاده از تکنیک PCR sequencing جهت شناسایی تمام گونه ها موثر تر باشد (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر، میزان موارد ابتلای به پیتیریازیس ورسیکالر و جداسازی مالاسزیا در سر، بیشتر از سایر اعضا بود و گونه‌ی غالب همانند مطالعه‌ی Sugita، مالاسزیا گلوبوزا بود. مالاسزیا رستریکتا نیز بعد از آن شایع‌ترین گونه بود.

در مطالعه مشابه دیگری که توسط میرهندی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ و در کشور ایران برای شناسایی گونه‌های مالاسزیا به روش PCR-RFLP با دو آنزیم محدودالاثر *CfoI* و *BstF51* انجام دادند، این روش قادر به شناسایی ۱۱ گونه‌ی استاندارد مالاسزیا و ۱۳ مورد از مالاسزیاهای جدا شده از نمونه‌های بالینی بود. آنها توانستند این نتایج را با تعیین توالی DNA نیز تأیید کنند (۱۰). با این حال، گونه های غالب در این مطالعه مالاسزیا فورفور و مالاسزیا رستریکتا بودند که با مطالعه حاضر متفاوت است. این تفاوت می تواند ناشی از اختلاف در میزان نمونه های مورد بررسی و حتی منطقه جغرافیایی مورد بررسی باشد.

در مطالعه دیگری که در ایران و در شهر یزد انجام شد، جعفری و همکاران نشان دادند که مالاسزیا گلوبوزا با ۳۸ درصد دارای بالاترین فراوانی و مالاسزیا اسلوفیه دارای کمترین فراوانی بودند (۲۳). لذا با وجود اینکه مالاسزیا گلوبوزا از لحاظ فراوانی تشابه زیادی به مطالعه حاضر دارد ولی در مورد دیگر گونه ها دارای اختلاف می باشد. تفاوت در گونه‌های مختلف مالاسزیاها در برخی مطالعات، می‌تواند گویای تفاوت‌های موجود در شرایط آب و هوایی منطقه، نوع تغذیه و سبک زندگی مردم و حتی روش‌های تعیین گونه مالاسزیاها باشد (۲۴و۱۲). بطور مثال گونه های شناسایی شده در مطالعه میرهندی که از نمونه های مبتلایان در شهر تهران استفاده شده بود، با مطالعه حاضر متفاوت بود که می تواند بخاطر شرایط آب و هوایی و تفاوت در سبک زندگی دو منطقه باشد (۱۰). زیرا هر دو مطالعه از یک تکنیک برای شناسایی مالاسزیاها استفاده کرده اند.

از لحاظ تفاوت در جنسیت مبتلایان در مطالعه حاضر، مردها بطور قابل ملاحظه ای (۶۴ درصد نسبت به ۳۶ درصد) بیشتر از زن ها بودند. منتها این نتیجه با دیگر نتایج بدست آمده در مطالعه طلایی در کاشان (۲۵) و جعفری در یزد (۲۳) که نسبت زن و مرد تقریباً یکسان بوده اند متفاوت است. این اختلاف می تواند بعلت متفاوت بودن جمعیت مورد مطالعه و حتی ویژگی های منطقه مورد مطالعه باشد. در همین مطالعه، سن مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر بین ۳۰-۲۱ سال بود که تقریباً با دیگر مطالعات انجام شده بر روی این مبتلایان، مطابقت دارد (۲۵و ۲۳). این مسئله می تواند نشان دهنده این

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مطلب باشد که تفاوت در منطقه جغرافیایی نمی تواند در گروه سنی مبتلایان تاثیر گذار باشد و این گروه سنی در مطالعات مختلف دارای بالاترین فراوانی می باشند. البته با توجه به چربی دوست بودن این گروه از قارچ ها، ابتلای بیشتر این گروه سنی بعلت فعالیت بیشتر غدد چربی در آنها دور از انتظار نبود. در عین حال در دیگر مطالعه ای که توسط Gupta به بررسی گونه های مالاسزیا در گروه های مختلف سنی انجام شد، گروه سنی ۲۵-۱۵ سال دارای بالاترین میزان ابتلا بودند (۲۶).

نکته دیگری که می توان به آن توجه نمود ولی در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است، رابطه فراوانی گونه های مختلف با سطح لیپید های خون است. در سه مطالعه مختلف که فتی و همکاران روی افراد مبتلا به هایپر لیپیدمی انجام دادند، متوجه شدند که بیشتر افراد مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، مبتلا به هایپرلیپیدمی بودند. با توجه به متفاوت بودن میزان چربی دوستی (لیپوفیلیک) گونه های مختلف، شاید این نکته قابل توجه باشد که افراد مبتلا به هایپر لیپیدمی می توانند به گونه های خاصی از مالاسزیا مبتلا شوند (۲۹-۲۷).

توسعه‌ی روش‌های مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی‌دوست مالاسزیا را فراهم نموده است. با وجود این، روش‌های رایج و متداول قدیمی هنوز هم در شرایط عدم دسترسی به روش‌های مولکولی در تشخیص اولیه‌ی گونه‌های مالاسزیا می‌توانند مورداستفاده قرار گیرند. در مطالعه حاضر، فقط ۵ درصد از مالاسزیاها با روش مولکولی PCR- RFLP ناشناخته ماندند ولی بقیه گونه ها توسط این روش شناسایی شدند. لذا استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص دقیق‌تر گونه‌های مالاسزیا لازم بوده و این امر می‌تواند پایه‌ای برای آگاهی متخصصین بالینی در خصوص درمان‌های دقیق‌تر و هدف‌دار گونه‌های مختلف باشد.

نتیجه گیری

گونه های غالب جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، به ترتیب مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا سیمپودیالیس بودند. ۳۳ درصد از نمونه ها دارای بیش از یک گونه مالاسزیا بودند. لذا استفاده از روش ساده و سریع PCR-RFLP برای شناسایی دقیق گونه های مالاسزیا در مطالعات اپیدمیولوژیک و حتی درمان های موثرتر می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مربوط به طرح مصوب شماره ۹۲۲۸۴۹ شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بخاطر تامین هزینه مالی این طرح تشکر می گردد. همچنین از پرسنل محترم آزمایشگاه قارچ شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد بویژه آقای قنبری کمال تشکر را داریم.

References

1.Kindo AJ, Sophia SK, Kalyani J, Anandan S. Identification of Malassezia species. Indian Journal of Medical Microbiology 2004;22:179-81.

2.Framil VM, Melhem MS, Szeszs MW, Corneta EC, Zaitz C. Pityriasis versicolor: isolation and identification of the main species of Malassezia. Anais Brasileiros De Dermatologia 2010;85:111-4.

3.Juncosa Morros T, Gonzalez-Cuevas A, Alayeto Ortega J, Munoz Almagro C, Moreno Hernando J, Gene Giralt A, et al. Cutaneous colonization by Malassezia spp. in neonates. Anales Espanoles de Pediatria 2002;57:452-6.

4.Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. Malassezia species in skin diseases. Current Opinion in Infectious Diseases 2002;15:133-42.

5.Baroni A, Paoletti I, Ruocco E, Agozzino M, Tufano MA, Donnarumma G. Possible role of Malassezia furfur in psoriasis: modulation of TGF-beta1, integrin, and HSP70 expression in

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017

human keratinocytes and in the skin of psoriasis-affected patients. Journal of Cutaneous Pathology 2004;31:35-42.
6.Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL, Jr. Skin diseases associated with Malassezia species. Journal of the American Academy of Dermatology 2004;51:785-98.
7.Yu HJ, Lee SK, Son SJ, Kim YS, Yang HY, Kim JH. Steroid acne vs. Pityrosporum folliculitis: the incidence of Pityrosporum ovale and the effect of antifungal drugs in steroid acne. International Journal of Dermatology 1998;37:772-7.
8.Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. Clinical Microbiology Reviews 2012;25:106-41.
9.Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, et al. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis. Journal of Clinical Microbiology 2002;40:1363-7.
10.Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Yamada T, Sugita T, Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. Journal of Microbiological Methods 2005;61:281-4.
11.Ashbee HR. Recent developments in the immunology and biology of Malassezia species. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2006;47:14-23.
12.Chaudhary R, Singh S, Banerjee T, Tilak R. Prevalence of different Malassezia species in pityriasis versicolor in central India. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology 2010;76:159-64.
13.Zarrinfar H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Mirhendi H. Incidence of pulmonary aspergillosis and correlation of conventional diagnostic methods with nested PCR and real-time PCR assay using BAL fluid in intensive care unit patients. Journal of Clinical Laboratory Analysis 2013;27:181-5.
14.Zarrinfar H, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Paknejad O. Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of Aspergillus fumigatus and A. flavus in solid organ transplant recipients. Mycopathologia 2013;176:377-85.
15.Zarrinfar H, Saber S, Kordbacheh P, Makimura K, Fata A, Geramishoar M, et al. Mycological microscopic and culture examination of 400 bronchoalveolar lavage (BAL) samples. Iranian Journal of Public Health 2012;41:70-6.
16.Zomorodain K, Mirhendi H, Tarazooie B, Kordbacheh P, Zeraati H, Nayeri F. Molecular analysis of Malassezia species isolated from hospitalized neonates. Pediatric Dermatology 2008;25:312-6.
17.Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathogens 2015;11:e1004523.
18.Velegraki A, Alexopoulos EC, Kritikou S, Gaitanis G. 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 2004;42:3589-93.
19.Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, et al. Identification of Malassezia species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clinical Microbiology and Infection 2002;8:162-73.
20.Guillot J, Gueho E. The diversity of Malassezia yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie van Leeuwenhoek 1995;67:297-314.

21.Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Species identification and strain typing of Malassezia species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. Journal of Medical Microbiology 2000;49:29-35. P
22.Castella G, Coutinho SD, Cabanes FJ. Phylogenetic relationships of Malassezia species based on multilocus sequence analysis. Medical Mycology 2014;52:99-105.
23.Jafari AA, Zarrinfar H, Mirzaei F, Katiraee F. Distribution of Malassezia species in patients with pityriasis versicolor compared with healthy individuals in Yazd, Iran. Jundishapur J Microbiol 2013;6:e6873.
24.Shah A, Koticha A, Ubale M, Wanjare S, Mehta P, Khopkar U. Identification and speciation of malassezia in patients clinically suspected of having pityriasis versicolor. Indian Journal of Dermatology. 2013;58:239.
25.Talaee R, Katiraee F, Ghaderi M, Erami M, Kazemi Alavi A, Nazeri M. Molecular identification and prevalence of Malassezia species in pityriasis versicolor patients from Kashan, Iran. Jundishapur J Microbiol 2014;7:e11561.
26.Gupta AK, Kohli Y. Prevalence of Malassezia species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. Medical Mycology 2004;42:35-42.
27.Vakili B, Fata A, Masomiyan AA, Adabi M. Study the relation of lipidemia & pityriasis versicolor in men. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2001;44:67-72.
28.Fata A, Javidi Z, Vakili B, Kosheshgaran ZT. The relation of lipidemia and pityriasis versicolor in women. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2002;44:18-23.
29.Fata A, Ghaderi R, Hashemian P, Hosseini SH, Keramati T. Prevalence of Pityrosporosis in students of Birjand University of Medical Sciences and comparison the efficacy effects of selenium sulphide & pyrition zinc shampoos in its treatment. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2002;45:41-8.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 16:20 +0330 on Saturday September 23rd 2017