

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

Hosseini Bafghi M., PhD<sup>1</sup>, Mozafari N.A., PhD<sup>2</sup>, Fata A.M. PhD<sup>3,4</sup>, Naseri A., PhD<sup>3</sup>, Zarrinfar H., PhD<sup>5</sup>

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

### 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 مالاسزیا در مبتلایان به پیتیریازیس و رسیکالر با روش مولکولی PCR-RFLP

سید مهدی حسینی بافتی<sup>۱</sup>، نور امیر مظفری<sup>۲</sup>، عبدالمجید قتی<sup>۳</sup>، علی ناصری<sup>۴</sup>، حسین زرین‌فر<sup>۵</sup>

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

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

۳. گروه انگل‌شناسی و فارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد.

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

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

### چکیده

**زمینه و هدف:** مالاسزیاها، مخمرهایی هستند که در شرایط خاص به عواملی بیماری‌زا در انسان تبدیل می‌شوند. مالاسزیاها دارای گونه‌های مختلفی بوده و می‌توانند بیماری‌هایی نظیر پیتیریازیس و رسیکالر (تینه آورسیکالر)، فولیکولیت مالاسزیایی، درماتیت سبورویک و حتی عفونت‌های سیستمیک را ایجاد کنند. در مطالعه حاضر، مالاسزیاها جدا شده از مبتلایان به پیتیریازیس و رسیکالر با روش مولکولی شناسایی شدند.

**روش بررسی:** در این مطالعه، پوسته‌های سر و بدن مبتلایان مشکوک به پیتیریازیس و رسیکالر بر روی محیط کشت دیکسون آگار کشت داده شده و در نهایت ۱۰۰ کلنی مالاسزیایی بدست آمد. ژنوم کلنی‌های 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 محدودالایتر *CfoI*، قطعات با الگوی‌های مشخص برای هر گونه‌ی مالاسزیا به دست آمد.

**یافته‌ها:** ایزوله‌های مالاسزیا شناسایی شده در نمونه‌های 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 گونه‌ها نیز بصورت ناشناخته باقی ماندند.

**نتیجه‌گیری:** گونه‌های غالب مبتلایان به پیتیریازیس و رسیکالر، به ترتیب مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا سیمپودیالیس بودند. ۳۳ درصد از نمونه‌ها دارای بیش از یک گونه مالاسزیا بودند، اگر چه روش PCR-RFLP برای شناسایی اغلب گونه‌های مالاسزیا بود، ولی ۵٪ از ایزوله‌ها قابل شناسایی نبودند.

**کلیدواژه‌ها:** مالاسزیا، پیتیریازیس و رسیکالر، PCR-RFLP

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

## مقدمه

گونه های مالاسزیا (*Malassezia spp.*) مخمرهایی اغلب چربی دوست بوده که به طور فلور نرمال بر روی پوست اغلب انسان ها زندگی می کنند. ولی در عین حال می توانند در شرایط خاصی به فرم بیماریزا درآمده و ایجاد علائم بالینی خاصی را بنمایند (۱). این مخمرها می توانند در قسمت های مختلف بدن ایجاد بیماری کنند (۲). مالاسزیاها معمولاً در قسمت هایی از بدن یافت می شوند که دارای مقادیر زیادی غدد چربی بوده و در حال حاضر شواهد نشان دهنده فراوانی بیشتر آن ها در پوست افراد بالغ می باشد. در مقابل، میزان کلنیزه شدن این مخمرها در کودکان نابالغ کم می باشد (۳). جنس مالاسزیا در رابطه با ایجاد بسیاری از بیماری هایی که بر روی پوست انسان تأثیر می گذارند از جمله پیتیریازیس ورسیکالر (تینه آ ورسیکالر)، فولیکولیت مالاسزیایی، درماتیت سبورئیک، شوره ی سر، آکنه استروئیدی، درماتیت آتوپیک و پسوریازیس شناخته شده اند (۴-۶). فولیکولیت مالاسزیایی ممکن است با آکنه اشتباه شود و بالعکس، به طوری که برخی بیماران ممکن است بعد از مصرف تتراسایکلین برای درمان فولیکولیت مالاسزیایی نشانه های آکنه را بروز بدهند (۷).

تاکنون ۱۴ گونه از جنس مالاسزیا شناخته شده اند که عبارتند از:

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

در روش های فیزیولوژیک، نوع مواد شیمیایی و ترکیبات محیط کشت باعث محدودیت در استفاده از روش های مورفولوژیک و فیزیولوژیک جهت تشخیص گونه های 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

روش های با حساسیت و ویژگی مناسب و با تکرار پذیری بالا به منظور تشخیص صحیح این مخمرها ضروری می باشد و لذا روش های مولکولی از اهمیت بالاتری برخوردار هستند. هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین هویت گونه های مالاسزیا جدا شده از سر و بدن مبتلایان به بیماری پیتیریازیس ورسیکالر در منطقه شاندیز-مشهد توسط روش مولکولی PCR-RFLP می باشد.

## 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 پوسته ها 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 پوسته ها و شوره های سر، پس از رنگ آمیزی با رنگ بلودومیلین، توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. بخش دیگری از نمونه ها بر روی محیط کشت دیکسون آگار (Quelab) کشت داده شدند.

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

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 به صورت زیر بود:

Initial denaturation (تقلیب یا واسرشت سازی اولیه)  
95°C for 6'  
Thermo-cycle file 35 cycles of  
Denaturation (تقلیب یا واسرشت سازی)  
94°C for 45"  
Annealing: 55°C for 60"  
Extension: 72°C for 45"  
Final extension (تکثیر تکمیلی)  
72°C for 7'  
4°C

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 عکس برداری شد.

در مرحله‌ی نهایی از آنزیم محدودالایر *CfoI* نوع Fast digest ساخت شرکت Fermentas جهت انجام آزمون RFLP استفاده گردید. بدین صورت 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 نمونه‌های مربوطه به داخل تیوب‌ها 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 ۳۷ °C قرار داده شدند.

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

برای استخراج DNA کروموزومی از کلنی‌های 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 و ۳۰۰ 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. تیوب‌ها سپس ۱۰ دقیقه 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 ۱۰/۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مجدداً مایع رویی را خارج کرده و حدود نیم ساعت جهت تبخیر کامل صبر کرده به طوری که 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  $\mu$ L

Each Primer = 0.5  $\mu$ M

D. W. = 10.5  $\mu$ L

Premix = 12.5  $\mu$ L

میزان مخلوط فوق بسته به تعداد نمونه‌ها و کنترل منفی محاسبه شده، داخل یخ (جهت پرهیز از اتصال پرایمرها به

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

### یافته ها

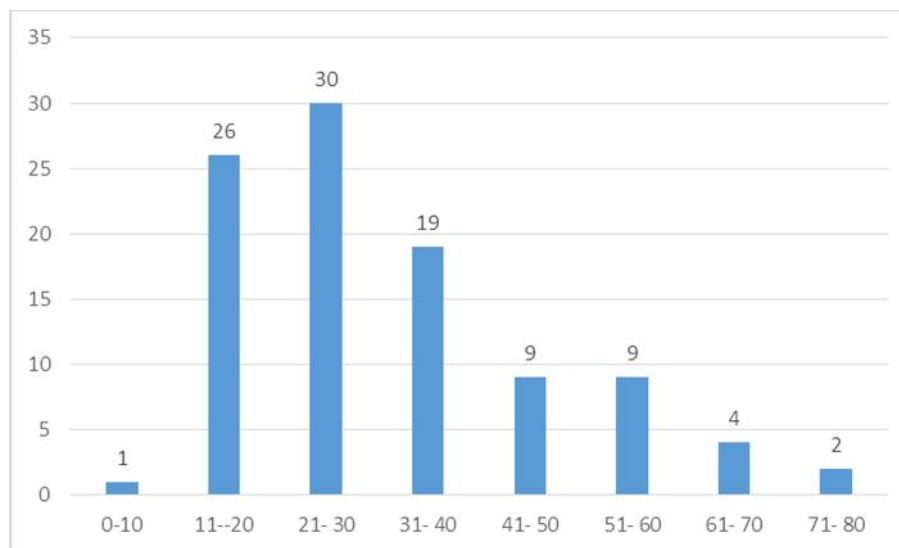
نمونه برداری از نواحی سر، صورت، گردن و لاله ی گوش افراد مشکوک مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر انجام شد که ۱۰۰ کلنی مثبت از بیماران مبتلا بدست آمد. نتایج PCR مالاسزیاهای جدا شده نشان دهنده اندازه باندهای حدود ۵۸۰

جدول ۱. توزیع فراوانی گونه های مالاسزیا در نمونه های (پوسته های) مبتلایان به پیتیریازیس و رسیکالر 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 رستریکتا	۱۱	۷	۴
مالاسزیا سیمپودیالیس	۷	۵	۲
مخلوط گلوبوزا و رستریکتا	۲۷	۱۷	۱۰
مخلوط سیمپودیالیس و رستریکتا	۴	۱	۳
مخلوط فورفور و گلوبوزا 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 و رسیکالر در میان گروه های سنی مختلف، بیشترین مبتلایان در گروه های 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).



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

## بحث

در مطالعه حاضر، شناسایی و تعیین هویت گونه های مالاسزیا در سر و بدن مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر در منطقه شاندریز-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 (۱۷ و ۱۸).

در سال های گذشته ملاک طبقه بندی مخمرهای جنس مالاسزیا بر اساس شاخص های 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 گونه های مالاسزیا مانند گلوبوزا، اوبتوزا و بخصوص رستریکتا، و از طرفی دیگر تشابه زیاد نتایج آزمایش های فیزیولوژیک و مشخصات مورفولوژیک بین برخی گونه های مالاسزیا مثل مالاسزیا فورفور، مالاسزیا سیمپودیالیس و اسلوفیه شناسایی این قارچ ها را از این طریق مشکل کرده است. همچنین وابستگی روش های فیزیولوژیک به عوامل مختلف باعث

محدودیت در استفاده از روش های فیزیولوژیک و همچنین مورفولوژیک در جهت تشخیص گونه های مالاسزیا شده است. لذا ارائه روش های کاملاً حساس با تکرار پذیری بالا و نیاز به حداقل میزان نمونه به منظور تشخیص صحیح این مخمرها ضروری می باشد. لذا استفاده از روش های مولکولی مناسب تر بنظر می رسند. زیرا این روش ها دقیق، حساس و سریع بوده و برخلاف روش های فنوتیپی که بسیار تحت شرایط محیطی قرار می گیرند از تکرار پذیری بالاتری برخوردارند.

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

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

در مطالعه مشابهی که توسط Sugita و همکارانش در سال ۲۰۰۶ انجام شد، مالاَسزیا های پوست را در موارد درماتیت اتوپیک توسط روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند که گونه های مالاَسزیا گلوبوزا و مالاَسزیا رستریکتا ۸۰٪ موارد را تشکیل می دادند (۹). با این حال، در مطالعه حاضر، ۵ درصد از مالاَسزیا هایی 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 مطالعه ی حاضر، میزان موارد ابتلای به پیتیریازیس ورسیکالر و جداسازی مالاَسزیا در سر، بیشتر از سایر اعضا بود و گونه ی غالب همانند مطالعه ی Sugita، مالاَسزیا گلوبوزا بود. مالاَسزیا رستریکتا نیز بعد از آن شایع ترین گونه بود.

در مطالعه مشابه دیگری که توسط میرهندی و همکارانش در سال ۲۰۰۵ و در کشور ایران برای شناسایی گونه های مالاَسزیا به روش PCR-RFLP با دو آنزیم محدود الاثر *CfoI* و

*BstF51* انجام دادند، این روش قادر به شناسایی ۱۱ گونه ی استاندارد مالاَسزیا و ۱۳ مورد از مالاَسزیا های جدا شده از نمونه های بالینی بود. آنها توانستند این نتایج را با تعیین توالی DNA نیز تأیید کنند (۱۰). با این حال، گونه های غالب در این مطالعه مالاَسزیا فورفور و مالاَسزیا 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 مالاَسزیا گلوبوزا با ۳۸ درصد دارای بالاترین فراوانی و مالاَسزیا اسلوفیه دارای کمترین فراوانی بودند (۲۳). لذا با وجود اینکه مالاَسزیا گلوبوزا از لحاظ فراوانی تشابه زیادی به مطالعه حاضر دارد ولی در مورد دیگر گونه ها دارای اختلاف می باشد. تفاوت در گونه های مختلف مالاَسزیاها در برخی مطالعات، می تواند گویای تفاوت های موجود در شرایط آب و هوایی منطقه، نوع تغذیه و سبک زندگی مردم و حتی روش های تعیین گونه مالاَسزیاها باشد (۲۴ و ۱۲). 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 مالاَسزیاها 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 بعلاوه تفاوت 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 (۲۵ و ۲۳). این مسئله می تواند نشان دهنده این

در مطالعه حاضر، فقط ۵ درصد از مالاسزیایاها با روش مولکولی PCR-RFLP ناشناخته ماندند ولی بقیه گونه ها توسط این روش شناسایی شدند. لذا استفاده از روش های مولکولی برای تشخیص دقیق تر گونه های مالاسزیا لازم بوده و این امر می تواند پایه ای برای آگاهی متخصصین بالینی در خصوص درمان های دقیق تر و هدف دار گونه های مختلف باشد.

### نتیجه گیری

گونه های غالب جدا شده از بیماران مبتلا به پیتریازیس 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, Szesz 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

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، ابتلا به بیشتر این گروه سنی بعلا 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 پیتریازیس ورسیکالر، مبتلا به هایپر لیپیدمی 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).

توسعه ی روش های مولکولی پایه و اساس طبقه بندی جدید مخمرهای چربی دوست مالاسزیا را فراهم نموده است. با وجود این، روش های رایج و متداول قدیمی هنوز هم در شرایط عدم دسترسی به روش های مولکولی در تشخیص اولیه ی گونه های مالاسزیا می توانند مورد استفاده قرار گیرند.



- 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, Katirae 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. Talae R, Katirae 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 Pityrosporiasis 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.