شناسایی گونه‌های *مالاسزیای* جداشده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر با استفاده از روش PCR-RFLP

دکتر مهناز محمودی‌راد[1]
اکرم میرامین محمدی[2]
دکتر پرویز طوسی[1]
دکتر علی خامسی‌پور[2]
دکتر امیرهوشنگ احسانی[3]
سیدابراهیم اسکندری[2]
نیکی محمودی‌راد[1]
یاسمن میردامادی[1]
زینب قاسمی[3]
محسن گرامی‌شعار[4]
شیما یونس‌پور[1]

۱. مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳. گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۴. گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

نویسنده‌ی مسئول:

دکتر اکرم میرامین محمدی
تهران، خیابان طالقانی غربی، شماره‌ی ۴۱۵، کدپستی: ۱۴۱۶۶۱۳۶۷۵، پست الکترونیک:
miramin48@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

زمینه و هدف: مالاسزیا قارچ دوشکلی و چربی‌دوست است که دارای گونه‌های مختلفی می‌باشد. بعضی از آن‌ها به صورت فلور طبیعی روی پوست وجود دارند و در شرایطی ایجاد بیماری می‌کنند. گونه‌های *مالاسزیا* در موارد پیتیریازیس ورسیکالر با استفاده از روش مولکولی تعیین گردید.

روش اجرا: از در این مطالعه‌ی توصیفی ۶۰ ایزوله‌ی بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP صورت گرفت. در این روش ناحیه‌ی Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) توسط پرایمرهای ITS 3 و ITS 4 تکثیر شد و توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی AluI، BanI و MspAI قطعات مشخصی برای هر گونه‌ی *مالاسزیا* به‌دست آمد.

یافته‌ها: گونه‌های جداشده از بیماران به ترتیب *مالاسزیا فورفور* (۳۶/۶۷٪)، *مالاسزیا گلوبوزا* (۳۰/۰٪)، *مالاسزیا سیمپودیالیس* (۲۰/۰٪)، *مالاسزیا اسلوفیئی* (۸/۳۳٪)، *مالاسزیا رستریکتا* (۳/۳۳٪) و *مالاسزیا آبتوسا* (۱/۶۷٪) بودند. در ضمن هیچ موردی از *مالاسزیا جاپونیکا*، *مالاسزیا پکی‌درماتیس*، *مالاسزیا درماتیس*، *مالاسزیا نانا* و *مالاسزیا یاماتوئنسیس* مشاهده نشد. گونه‌ی *مالاسزیا سیمپودیالیس* در گروه زنان بیشتر از گروه مردان مشاهده شد (P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: شایع‌ترین گونه‌ی جداشده از ضایعه‌های پیتیریازیس ورسیکالر، *مالاسزیا فورفور* و پس از آن *مالاسزیا گلوبوزا* بود.

کلیدواژه‌ها: مالاسزیا، پیتیریازیس ورسیکالر، PCR-RFLP

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۳۱

پوست و زیبایی؛ تابستان ۱۳۹۰، دوره‌ی ۲ (۲): ۱۱۴-۱۰۶

Archive of SID

مقدمه

پیتیریازیس ورسیکالر بیماری قارچی مزمن طبقه‌ی شاخی پوست است که با ایجاد ضایعاتی به رنگ‌های مختلف در پوست مشخص می‌شود. بیماری اغلب در سن بلوغ و میانسالی که مقدار ترشحات چربی و غلظت آن‌ها در پوست به حداکثر می‌رسد دیده می‌شود. بنابراین در بچه‌ها کم‌بودن میزان چربی موجب کاهش میزان وقوع آن می‌گردد. این بیماری دارای انتشار جهانی بوده و در نواحی گرمسیر شیوع بیشتری دارد[1]. در ایران پیتیریازیس ورسیکالر در مناطق گرم و

www.SID.ir

مرطوب جنوبی شیوع فراوان دارد. استرس، عفونت‌های مزمن، فقر بهداشتی، عرق‌کردن فراوان، سوءتغذیه، زمینه‌ی ژنتیکی، استفاده‌ی طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌های با محدوده‌ی اثر وسیع، پوشش‌های تنگ نایلونی و استفاده از استروئیدها از جمله عوامل مستعدکننده‌ی ابتلا به این بیماری هستند[۲]. تاکنون ۱۱ گونه از *مالاسزیا* از جمله *مالاسزیا فورفور*، *مالاسزیا اسلوفیئی*، *مالاسزیا گلوبوزا*، *مالاسزیا سیمپودیالیس*، *مالاسزیا پاکی‌درماتیس*، *مالاسزیا رستریکتا* و *مالاسزیا آبتوسا* با روش‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی شناخته شده که در نواحی مختلف جهان درصدهای متفاوتی از آن‌ها گزارش گردیده است[۳].

مالاسزیا مخمری دو شکلی است که به صورت فلور طبیعی روی پوست بدن وجود دارد. این قارچ فرصت‌طلب بوده و می‌تواند به صورت تهاجمی در میزبان مستعد، بیماری پیتیریازیس ورسیکالر ایجاد کند[۴]. این ارگانیسم اغلب در قسمت‌هایی از بدن که غدد سباسه فعال‌تر هستند دیده می‌شود. گونه‌های *مالاسزیا* تمایل دارند که از چربی‌ها به عنوان سوبسترا استفاده کنند و اغلب گونه‌ها نیاز مطلق خود را از آن‌ها به‌دست می‌آورند. در محیط‌های کشت آزمایشگاهی به‌ندرت جدا می‌شوند به جز در مواردی که نیازهای تغذیه‌ای خاص آن‌ها در محیط‌های اختصاصی فراهم شود[۵].

در سال‌های گذشته هفت گونه از *مالاسزیا* شامل *مالاسزیا فورفور*، *مالاسزیا اسلوفیئی*، *مالاسزیا گلوبوزا*، *مالاسزیا سیمپودیالیس*، *مالاسزیا پکی‌درماتیس*، *مالاسزیا رستریکتا* و *مالاسزیا آبتوسا* با روش‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی شناخته شده که در نواحی مختلف جهان میزان شیوع متفاوتی از آن‌ها گزارش گردیده است[۳و۶]. اخیراً چهار گونه‌ی دیگر شامل *مالاسزیا درماتیس*، *مالاسزیا جاپونیکا*، *مالاسزیا نانا* و *مالاسزیا یاماتوئنسیس* به گونه‌های جنس *مالاسزیا* افزوده شده است و ارتباط آن‌ها با بیماری‌های پوستی در دست بررسی می‌باشد[۶].

روش‌هایی که برای طبقه‌بندی مولکولی گونه *مالاسزیا* به کار گرفته شده‌اند را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: روش‌هایی که اختلافات سکانس استرین‌ها را شناسایی می‌کنند و روش‌هایی که مارکرهای DNA پلی‌مرفیک را برای افتراق زیرتایپ‌های گونه‌های *مالاسزیا* تکثیر می‌کنند.

در سال‌های گذشته روش‌های گوناگون تایپینگ مولکولی بر اساس PCR یک قطعه‌ی مشخص و به‌دنبال آن جست‌وجوی موتاسیون‌ها در آن قطعه انجام شده است[۶-۱۳].

در آینده‌ی نزدیک، تایپینگ مولکولی بهترین وسیله برای مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد بود و توسط این روش‌ها می‌توان پاتوبیولوژی گونه‌های *مالاسزیا* را در ارتباط با بیماری‌های پوستی توضیح داد[۶].

در حال حاضر تمام گونه‌های *مالاسزیا* توسط خصوصیات میکروسکوپیک، شکل ظاهری کلونی و آزمایش‌های پیچیده و وقت‌گیر جذب چربی قابل‌شناسایی هستند. نتایج این تست‌ها را می‌توان با روش‌های دقیق اما پرهزینه‌ای نظیر pulsed field gel electrophoresis، recombinant RNA sequencing و مقایسه‌ی DNA هسته تأیید کرد. تست‌هایی نیز وجود دارند که با هزینه‌ی کمتر و با سرعت بیشتر قادر به شناسایی گونه‌های کاندیدا می‌باشند از آن جمله PCR-RAPD که در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار استفاده شده است. در سال ۲۰۰۲، Gaitanis و همکارانش یک روش مستقیم و مقرون به صرفه را برای جداسازی و شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* در مطالعات اپیدمیولوژیکی معرفی نمودند. جداسازی مستقیم DNA *مالاسزیا* از پوسته‌ی بیماران تا آن موقع صورت نگرفته بود و آن‌ها از دو پرایمر که

Archive of SID
www.SID.ir

ناحیه‌ی 5.8S و بخشی از ناحیه‌ی 28S را در rDNA تکثیر می‌کرد همراه با سه آنزیم اندونوکلئاز تحدیدی *Alu*I، *Hinf*I و *Msp*I جهت انجام PCR-RFLP استفاده نمودند. این روش برای شناسایی ۷ گونه‌ی *مالاسزیا* که تا آن زمان شناخته شده بود در شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* در نمونه‌های پوسته‌ی بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبورئیک به کار گرفته شد[۱۴]. در سال ۲۰۰۶ همین محققین بعد از شناسایی ۴ گونه‌ی دیگر *مالاسزیا*، با تغییر برخی از اندونوکلئازها روش شناسایی گونه‌ها با PCR-RFLP را برای هر ۱۱ گونه تعمیم دادند[۶].

در مطالعه‌ی حاضر از این روش PCR-RFLP برای شناسایی و مقایسه‌ی گونه‌های *مالاسزیا* در پوسته‌های جداشده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر استفاده شده است.

روش اجرا

این مطالعه از دی‌ماه ۱۳۸۷ به مدت یک سال روی ۶۵ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر مراجعه‌کننده به درمانگاه پوست بیمارستان شهدای دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، و بیمارستان رازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. از این افراد توسط اسکالپل استریل نمونه‌ی پوسته تهیه، و در پاکت‌های سیاه جمع‌آوری شد. هم‌چنین سه سویه‌ی *مالاسزیا فورفور* (CBS9577)، *مالاسزیا سیمپودیالیس* (CBS7222) و *مالاسزیا گلوبوزا* (CBS7874) به عنوان شاهد در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. از بیماران بعد از تأیید رضایت‌نامه، نمونه‌گرفته می‌شد و نیز پرسش‌نامه‌ای برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد بیماری تکمیل می‌گردید. برای استخراج DNA از نمونه‌ها، از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer Corporation) استفاده شد. برای تکثیر DNA استخراج شده، به هر میکروتیوبِ کیت PCR، میزان دو میکرولیتر از DNA استخراج شده و چهار میکرولیتر از مخلوط آماده‌شده از دو پرایمر یونیورسال با سکانس‌های زیر افزوده می‌شد:

ITS3 (5́-GCATCGATCAAGAACGCAGC-3́)

ITS4 (5́-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3́)

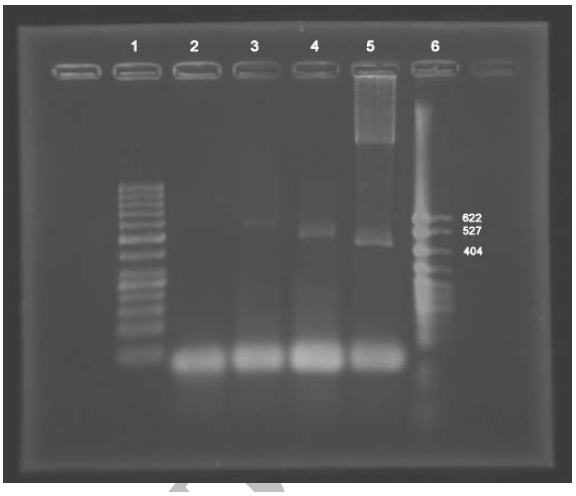
حجم مخلوط واکنشی بعد از افزودن پرایمرها و DNA نمونه‌ها با آب دیونیزه به ۲۰ لاندا رسانده می‌شد و میکروتیوب‌ها برای تکثیر DNA در داخل دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient قرار داده می‌شدند. تنظیم دستگاه برای انجام یک سیکل ۳ دقیقه‌ای با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل: ۱ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون، ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمرها و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای پلیمریزاسیون توسط Taq پلیمراز و در نهایت یک سیکل ۵ دقیقه‌ای با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای پلیمریزاسیون نهایی صورت می‌گرفت.

محصول PCR بر روی یک ژل آگاروز ۴٪ بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید قابل مشاهده بود. با انجام RFLP توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی *Alu*I، *Ban*I و *Msp*AI قطعات مشخصی برای هر یک از گونه‌های *مالاسزیا* توسط ژل الکتروفورزیس محصول هضم‌شده توسط آنزیم‌ها به‌دست آمد که بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید این قطعات قابل مشاهده بود.

یافته‌ها

از ۶۵ بیمار تحت مطالعه، ۵ بیمار (۷٫۷٪) از نظر مالاسزیا منفی بودند و از مطالعه کنار گذاشته شدند. از ۶۰ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، ۴۰ بیمار (۶۶٫۷٪) مرد بودند. میانگین و انحراف معیار سن بیماران به ترتیب ۳۱٫۲۲ و ۱۱٫۷۱ سال (دامنه‌ی سنی ۶۰-۱۲ سال) بود.

Archive of SID
www.SID.ir

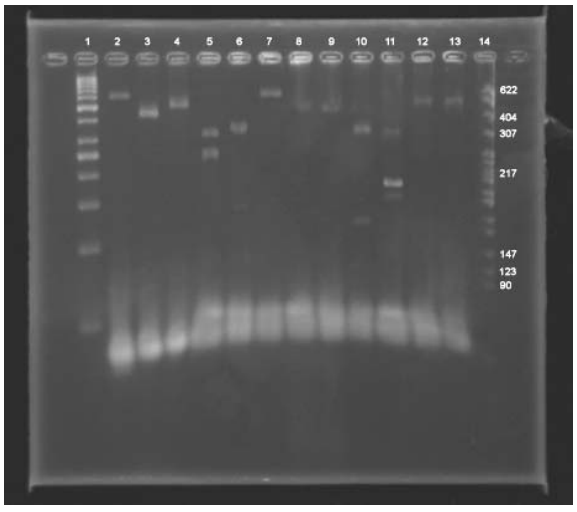


تصویر ۱: نمونه‌های بیمار در کنار مارکر در ژل آگاروز الکتروفورز شده‌اند: ردیف ۱ مارکر ۵۰bp، ردیف ۲ کنترل منفی، ردیف ۳ *مالاسزیا فورفور* (جدا شده از نمونه‌ی بالینی)، ردیف ۴ *مالاسزیا گلوبوزا* (جدا شده از نمونه‌ی بالینی)، ردیف ۵ *مالاسزیا سیمپودیالیس* (جدا شده از نمونه‌ی بالینی)، ردیف ۶ مارکر pBR322 *Msp*I digest.

طول باندهای به‌دست‌آمده برای گونه‌ی *مالاسزیا فورفور* ۵۵۷، *مالاسزیا آبتوسا* ۵۵۴، *مالاسزیا جاپونیکا* ۵۲۸، *مالاسزیا گلوبوزا* ۴۷۷، *مالاسزیا اسلوفیئی* ۵۰۵، *مالاسزیا پکی‌درماتیس* ۵۲۹، *مالاسزیا سیمپودیالیس* ۴۲۰، *مالاسزیا یاماتوئنسیس* ۴۷۰، *مالاسزیا درماتیس* ۴۱۶، *مالاسزیا رستریکتا* ۴۶۳ و *مالاسزیا نانا* ۴۲۸ جفت باز می‌باشد[۶].

تصاویر ۱ و ۲ نمونه‌هایی از باندهای به‌دست‌آمده از الکتروفورز محصولات PCR و سپس باندهای حاصل از هضم آنزیمی محصولات PCR توسط سه آنزیم به‌کار رفته در این تحقیق را نشان می‌دهد.

همان‌طور که در تصویر ۲ دیده می‌شود قطعه‌ی ۴۲۰ جفت بازی PCR شده‌ی *مالاسزیا سیمپودیالیس* تنها به‌وسیله‌ی آنزیم MspAI به سه قطعه‌ی ۲۸۱، ۱۰۹ و ۳۰ جفت بازی تقسیم شده است و دو آنزیم دیگر ناحیه‌ای برای شکستن در قطعه‌ی PCR شده ندارند[۶].



تصویر ۲: چند نمونه مالاسزیای جداشده از بیماران قبل و بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR توسط ۳ اندونوکلئاز تحدیدی AluI، BanI و MspAI در کنار دو مارکر مشاهده می‌شوند. ردیف ۱ مارکر ۵۰bp، ردیف ۲ *مالاسزیا فورفور*، ردیف ۳ *مالاسزیا سیمپودیالیس*، ردیف ۴ *مالاسزیا گلوبوزا*، ردیف ۵ *مالاسزیا فورفور* AluI، ردیف ۶ *مالاسزیا فورفور* BanI، ردیف ۷ *مالاسزیا فورفور* MspAI، ردیف ۸ *مالاسزیا سیمپودیالیس* AluI، ردیف ۹ *مالاسزیا سیمپودیالیس* BanI، ردیف ۱۰ *مالاسزیا سیمپودیالیس* MspAI، ردیف ۱۱ *مالاسزیا گلوبوزا* AluI، ردیف ۱۲ *مالاسزیا گلوبوزا* BanI، ردیف ۱۳ *مالاسزیا گلوبوزا* MspAI و ردیف ۱۴ مارکر pBR322 *Msp*I digest است.

هم‌چنین در مورد *مالاسزیا فورفور* قطعه‌ی ۵۵۷ جفت بازی حاصل از PCR، به‌وسیله‌ی آنزیم *Alu*I به دو قطعه‌ی ۳۰۶ و ۲۵۱ جفت بازی، توسط آنزیم *Ban*I به دو قطعه‌ی ۳۸۹ و ۱۶۸ جفت بازی و با آنزیم *Msp*AI به دو قطعه‌ی ۵۲۵ و ۳۲ جفت بازی تقسیم شده است[۶].

قطعه‌ی ۴۷۷ جفت بازی PCR شده‌ی *مالاسزیا گلوبوزا* توسط به‌وسیله‌ی آنزیم *Alu*I به سه قطعه‌ی ۲۴۰، ۲۲۱ و ۱۶ جفت بازی، توسط آنزیم *Ban*I هضم‌نشده و با آنزیم *Msp*AI به دو قطعه‌ی ۴۴۷ و ۳۰ جفت بازی تقسیم شده است[۶].

www.SID.ir

جدول ۱: توزیع فراوانی گونه‌های *مالاسزیا* در نمونه مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر به روش PCR-RFLP

گونه‌های مالاسزیا	فراوانی	درصد
M. furfur	۲۲	۳۶/۶۷
M. globosa	۱۸	۳۰/۰۰
M. sympodialis	۱۲	۲۰/۰۰
M. slooffiae	۵	۸/۳۳
M. restricta	۲	۳/۳۳
M. obtusa	۱	۱/۶۷
کل	۶۰	۱۰۰

جدول ۱، توزیع فراوانی گونه‌های *مالاسزیا* در نمونه مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر را نشان می‌دهد. در بیماران تحت مطالعه، گونه‌های *M. pachydermatidis*، *M. japonica*، *M. dermatis*، *M. nana* و *M. yamatoensis* مشاهده نشد.

از ۵۷ بیماری که اطلاعات مربوط به فرم بالینی برای آن‌ها ثبت شده بود، فرم بالینی ۴۵ بیمار (۷۹٪) به‌صورت هایپرپیگمانته و در ۱۲ بیمار (۲۱/۰٪) به صورت هایپوپیگمانته بود. با استفاده از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی *مالاسزیا* و فرم بالینی مشاهده نشد (*P*=۰/۲).

در این پژوهش، وجود عوامل مستعدکننده‌ی پیتیریازیس ورسیکالر از جمله تعریق زیاد، ابتلا به دیابت شیرین، بارداری، نقص ایمنی و مصرف استروئید بررسی گردید. تعریق زیاد در ۳۱ بیمار (۵۱/۶۷٪)، دیابت شیرین در ۳ بیمار (۵٪)، بارداری در ۲ بیمار (۳/۳۳٪)، مصرف استروئید در ۳ بیمار (۵٪) مشاهده شد و در ۲۴ بیمار (۴۰٪) هیچ یک از موارد فوق مشاهده نگردید.

با استفاده از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی مالاسزیا و سن مشاهده نشد (*P*=۰/۲). هم‌چنین ابتلا در ۳۲ بیمار (۵۳/۳٪) برای بار اول بوده و ۲۸ بیمار (۴۶/۷٪) عود داشته‌اند.

گونه‌های *M. globosa* و *M. furfur* در گروه مردان بیشتر از گروه زنان و گونه‌ی *M.sympodialis* در گروه زنان بیشتر از گروه مردان مشاهده شد. در گروه زنان، بیشترین فراوانی گونه‌ها مربوط به گونه‌های *M. sympodialis* و *M. globosa* و در گروه مردان، بیشترین فراوانی مربوط به گونه‌های *M. furfur* و *M. globosa* بود. از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی *مالاسزیا* و جنس بیماران مشاهده شد (جدول ۲) (*P*=۰/۰۲).

بحث

نتایج نشان داد که روش PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* بسیار ساده و مناسب می‌باشد.

از میان ۶۰ نمونه‌ی مثبت به‌دست آمده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، حدود ۳۰٪ *مالاسزیا گلوبوزا*، ۳۶/۶۷٪ *مالاسزیا فورفور* و ۲۰٪ *مالاسزیا سیمپودیالیس* جداسازی شد. این نشان می‌دهد که برخلاف اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی در دنیا که *مالاسزیا گلوبوزا* گونه‌ی غالب در بیماران است[۱۷-۱۵و۷]، در این مطالعه‌ی *مالاسزیا فورفور* گونه‌ی غالب در

جدول ۲: توزیع فراوانی گونه‌های *مالاسزیا* براساس جنس بیماران

جنس	گونه‌های *مالاسزیا*					
	M. globosa	*M. furfur*	*M. slooffiae*	*M. sympodialis*	سایر گونه‌ها	کل
زن	۵	۳	۳	۸	۱	۲۰
مرد	۱۳	۱۹	۲	۴	۲	۴۰
کل	۱۸	۲۲	۵	۱۲	۳	۶۰

Archive of SID
www.SID.ir

بیماران می‌باشد. در تحقیق Aspiroz در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا بر روی ۷۹ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، *مالاسزیا گلوبوزا* و *سیمپودیالیس* بیشترین موارد جداشده از بیماران بودند[۱۵]. ناکاباياشی در سال ۲۰۰۲ برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* در بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبورئیک از تست توئین استفاده نمود. در موارد درماتیت سبورئیک *مالاسزیا گلوبوزا* و *مالاسزیا فورفور* به ترتیب بیشترین گونه‌های جداشده را تشکیل می‌دادند. در تعدادی از بیماران چند گونه‌ی مالاسزیا به‌طور هم‌زمان از ضایعات جدا گردید[۱۶] که چنین حالتی در بیماران مورد مطالعه‌ی ما دیده نشد. در سال ۲۰۰۶ در یونان Gaitanis و همکارانش شیوع گونه‌های *مالاسزیا* را در دو بیماری پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبورئیک بررسی کردند. بیشترین گونه‌های جداشده *مالاسزیا گلوبوزا* و *مالاسزیا رستریکتا* به ترتیب با ۷۷٪ و ۳۹٪ به تنهایی و ۱۳٪ و ۱۸٪ همراه با گونه‌های دیگر بودند[۱۳]. در سال ۲۰۰۹ کاراکاس و همکارانش در آدانای ترکیه گونه‌های *مالاسزیا* را در ۹۷ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر شناسایی کردند. از ۹۷ مورد پوسته‌ی کشت داده شده روی محیط تغییریافته (modified) دیکسون، تنها ۴۴ مورد رشد داشتند. *مالاسزیا گلوبوزا* با ۴۷٫۷٪ بیشترین موارد را تشکیل می‌داد و بعد از آن *مالاسزیا فورفور* (۳۶٫۴٪) و *مالاسزیا اسلوفیئی* (۱۵٫۹٪) قرار داشتند. در هیچ یک از موارد چند گونه‌ی *مالاسزیا* از یک بیمار جدا نگردید[۱۸] که این حالت با مطالعه‌ی ما هم‌خوانی داشت. راثی در سال ۲۰۱۰ میزان شیوع گونه‌های *مالاسزیا* را در ضایعات پیتیریازیس ورسیکالر در تهران بررسی نمود. از ۱۶۶ شرکت‌کننده در تحقیق ۱۱۶ مورد کشت مثبت داشتند. *مالاسزیا گلوبوزا* در ۳۱٫۳٪، *مالاسزیا فورفور* ۲۰٫۵٪، *مالاسزیا پکی‌درماتیس* ۷٫۲٪، *مالاسزیا رستریکتا* ۷٫۲٪ و *مالاسزیا اسلوفیئی* در ۳٫۶٪ موارد جدا شد[۱۹]. نتایج این بررسی نیز با مطالعه‌ی ما متفاوت بود و *مالاسزیا گلوبوزا* از شیوع بیشتری برخوردار بود. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ در اندونزی بر روی ۹۸ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر انجام گرفت بیشترین میزان شیوع را گونه‌ی *مالاسزیا فورفور* (۴۲٫۹٪) تشکیل می‌داد[۲۰] که مشابه نتایج ما بود.

از جمله مطالعات انجام شده برای تشخیص گونه‌های *مالاسزیا* به روش مولکولی، مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۰۵ میرهندی و همکارانش برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* از روش PCR-RFLP با دو آنزیم تحدیدی *Cfo*1 و *Bst*F51 انجام دادند. این روش قادر به شناسایی ۱۱ گونه‌ی استاندارد *مالاسزیا* و هم ۱۳ مورد از نمونه‌های بالینی بود و آن‌ها نتیجه را با تعیین ترادف DNA نیز تأیید کردند[۲۱].

در سال ۲۰۰۶ Gaitanis و همکارانش از PCR-RFLP ناحیه‌ی ITS2 برای شناسایی ۱۱ گونه‌ی *مالاسزیا* استفاده کردند. این روش ساده، با ثبات و تکرارپذیر بود و با DNA استخراج شده از پوسته قابل انجام بود[۶]. در مطالعه‌ی حاضر از همین روش برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد زیرا هزینه و زمان لازم برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* با استفاده از آن کاهش می‌یابد.

در سال‌های اخیر توسعه‌ی روش‌های مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی‌دوست *مالاسزیا* را فراهم نموده است[۲۲و۲۳]. با وجود این روش‌های رایج و متداول قدیمی به عنوان خصوصیتی کلیدی در تشخیص اولیه‌ی گونه‌های *مالاسزیا* استفاده می‌شود.

تخریب دیواره‌ی سلولی، اصلی‌ترین مرحله‌ی استخراج DNA در مخمرهاست. از آن‌جا که جنس *مالاسزیا* دارای دیواره‌ی سلولی چند لایه‌ای است که به آن توانایی مقاومت بالا در برابر عوامل فیزیکی و

Archive of SID
www.SID.ir

شیمیایی را می‌دهد، شکستن و تخریب دیواره‌ی سلولی مخمر به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. از این رو در تحقیق حاضر مرحله‌ی تخریب دیواره‌ی سلولی طی زمان انکوباسیون طولانی سلول‌های مخمری در آنزیم و بافر لیزکننده، انجام گرفت و کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer) برای این منظور کاملاً مناسب بود. در ضمن همان‌طور که در بررسی‌های گذشته ذکر شده، سه ناحیه‌ی ITS1، ITS2 و IGS1 بهترین پتانسیل را برای تایپینگ گونه‌های *مالاسزیا* دارند[8] که در مطالعه‌ی ما ناحیه‌ی ITS2 مورد استفاده قرار گرفت.

References

1. Emami M, Kordbacheh P, Moghadami M, Zeini F, Medical Mycology. 4th ed.Tehran: 1999; pp. 97-9.
2. Dorn M, Roehnert K. Dimorphism of Pityrosporum orbicular in a defined culture medium. J Invest Dermatol 1977; 62: 244-8.
3. Gupta AK, Kohlt Y. Epidemiology of malassezia yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. Med Mycol 2001; 39: 199-206.
4. Rippon JW. Medical mycology. 3rd Ed. Philadelphia. Saunders, 1988; P. 155.
5. Zeini F, Mahbod AA, Emami M. Medical Mycology. 1st Ed. Tehran. Tehran University of Medical Sciences Publications, 2001; P. 64.
6. Gaitanis G. Verifiable single nucleotide polymorphisms of the internal transcribed spacer 2 region for the identification of 11 Malassezia species. J of Dermatol Sci 2006; 43: 214-217.
7. Inamadar AC. The genus Malassezia and human disease. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2003; 69: 265-70.
8. Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. The range of molecular methods for typing Malassezia. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 119-25.
9. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of Malassezia microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. J Invest Dermatol 2008; 128: 345-51.
10. Theelen B, Silvestri M, Gue´ho E, et al. Identification and typing of Malassezia yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Res 2001; 1: 79-86.
11. Yamada Y, Makimura K, Ueda K, et al. DNA base alignment and taxonomic study of genus Malassezia based upon partial sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. Microbiol Immunol 2003; 47: 475-8.
12. Cafarchia C, Stefania Latrofa M, Testini G, et al. Molecular characterization of Malassezia isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. Mol Cell Probes 2007; 21: 229-38.
13. Gaitanis G. Distribution of Malassezia species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate M. globosa. British J of Dermatol 2006; 154: 854-9.
14. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, et al. Identification of Malassezia species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 162-73.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Aspiroz C. Isolation of Malassezia globosa and M. sympodialis from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 2002; 154:111-7.

16. Nakabayashi A. Identification of causative species in Malassezia-associated dermatoses. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2002; 43:65-8.

17. Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycological study in India. Int J Dermatol 2002; 41: 823-4.

18. Karakaş M, Turaç-Biçer A, Ilkit M, et al. Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey. J Dermatol 2009; 36: 377-82.

19. Rasi A, Naderi R, Behzadi AH, et al. Malassezia yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study. Mycoses 2010; 53: 350-5.

20. Krisanty RI, Bramono K, Made Wisnu I. Identification of Malassezia species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. Mycoses 2009; 52: 257-62.

21. Mirhendi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiol Methods 2005; 61:281-4.

22. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, et al. Differentiation of Malassezia species: Selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for M. furfur. Br J Dermatol 1997; 137: 208-13.

23. Affes M, Salah SB, Makni F, et al. Molecular identification of Malassezia species isolated from dermatitis affections. Mycoses 2009; 52: 251-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of *Malassezia* species associated with pityriasis versicolor using PCR-RFLP

Mahnaz Mahmoudi Rad, PhD[1]
Akram Miramin Mohammadi, MSc[2]
Parviz Tousi, MD[1]
Ali Khamesipour, PhD[1]
Amirhoushang Ehsani, MD[3]
Yasaman Mirdamadi[1]
Seyyed Ebrahim Eskandari, MSc[2]
Niki Mahmoudi Rad, BSc[1]
Mohsen Gerami Shoar, MSc[4]
Shima Younespour, MSc[1]
Zeinab Ghasemi, BSc[3]

1. Skin Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Center for Research and Training in Skin Diseases and Leprosy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Razi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author:
Akram MirAmin Mohammadi, MSc

No. 415, Taleqani Avenue, Tehran, 14166-13675, Iran.
Email: miramin48@yahoo.com

Conflict of interest: None to declare

Background and Aim: *Malassezia* is a lipophilic and dimorphic fungus which has different species. Some of them can be found as natural flora on skin and in some conditions may cause pityriasis versicolor. The aim of this study was to identify *Malassezia* species associated with pityriasis versicolor in Iranian patients, using PCR-RFLP.

Methods: In this study out of 65 patients with pityriasis versicolor to have pityriasis versicolor,isolates of 60 patients were positive. *Malassezia* species. using by PCR-RFLP. The Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) region was amplified by PCR employing the ITS3 and ITS4 primers and The restriction endonucleases *Alu*I, *Ban*I and *Msp*AI were selected for producing distinct RFLP patterns.

Results: *M. furfur* (36.7%), *M. globosa* (30.0%), *M. sympodialis* (20.0%), *M. slooffiae* (8.3%), *M. restricta* (3.3%) and *M. obtusa* (1.7%) were the microorganisms responsible for the infection among participants. The *M. sympodialis* infection was strongly correlated with the female gender (P=0.02).

Conclusion: Our findings suggest that, the most common *Malassezia* species associated with pityriasis versicolor was *M. furfur*, followed by *M. globosa*.

Key words: *Malassezia*; pityriasis versicolor; PCR-RFLP

Received: Feb 12, 2011 Accepted: May 22, 2011

Dermatology and Cosmetic 2011; 2 (2): 106-114

www.SID.ir