معرفی ایزوله جدیدی از قارچ‌های مخمری جنس مالاسزیا (*Malassezia*) بر اساس آنالیز توالی نوکلئوتیدهای ناحیه 26S و ITS1 در DNAی ریبوزومی

سیدحسین میرهندی .Ph.D[1*]، محمدعلی ضیا .Ph.D[2]، کوئیچی ماکی‌مورا .M.D، .Ph.D[3]

۱. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران
۳. انستیتو قارچ‌شناسی پزشکی دانشگاه تیکیو، توکیو، ژاپن

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی
پست الکترونیک: Email:mirhendi@tums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۱، پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۲۲

چکیده

گزارش حاضر بر اساس توالی اسیدهای نوکلئیک ناحیه D1/D2 26S rDNA که توالی ناحیه ITS1 که مارکرهایی برای افتراق گونه‌هاست، ایزوله جدیدی از این جنس را معرفی می‌نماید.
نمونه کشت داده شد و کلونی مالاسزیای مجهول جداسازی گردید. با استفاده از دو جفت پرایمر، یکی جهت قطعه D1/D2 موجود درناحیه 26S و دیگری ناحیه TS1 مربوط به DNAی ریبوزومی، PCR انجام شده و توالی نوکلئوتیدی قطعات مزبور تعیین گردید. توالی‌ها مورد آنالیز قرار گرفته و با توالی‌های همان نواحی در سایر مالاسزیاها و سایر میکروارگانیسم‌ها مقایسه شد.
کلونی‌های رشد یافته و نیز مورفولوژی میکروسکوپی سلول‌های مخمری حکایت از وجود مخمرهایی از جنس مالاسزیا داشت. با اجرای واکنش PCR یک قطعه DNA به وزن حدود ۵۸۰ جفت بازو مشابه با سایر مالاسزیاها مشاهده گردید. برش محصول PCR با آنزیم *CfoI*، و الکتروفورز محصولات RFLP، الگویی به دست آمد که با هیچ کدام از مالاسزیاهای شناخته شده مطابقت نداشت. با الکتروفورز محصول PCR مربوط به ITS1 نیز یک باند به وزن حدود ۲۸۰ جفت باز مشاهده گردید. پس از آنالیز توالی‌های 26S و ITS1 مشخص شد که سکانس‌های این ایزوله با سایر مالاسزیاها به میزان قابل توجهی تفاوت دارد.
با توجه به الگوی جدیدی که در نتایج حاصل از RFLP ناحیه 26S rDNA مشاهده شد و نظر به اینکه نواحی D1/D2 و نیز ITS1 موجود در کمپلکس ژنی rDNA مارکرهای پذیرفته شده‌ای برای تعیین جایگاه تاکسونومیک مالاسزیاها می‌باشند و از آنجا که این نواحی در مالاسزیای جدا شده در طی این تحقیق دارای توالی نوکلئوتیدی کاملا متفاوت با سایر مالاسزیاها بود، به عنوان یک ایزوله با مشخصات ژنتیکی و تاکسونومیک جدید معرفی می‌شود.

* **کلیدواژگان:** مالاسزیا، DNA ریبوزومی، طبقه‌بندی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۴۹-۲۴۴

مقدمه

مخمرهای وابسته به جنس مالاسزیا (*Malassezia*) فلور طبیعی پوست انسان و حیوانات خون‌گرم می‌باشد. از خصوصیات عمده این مخمرها نیاز به چربی لازمه رشد و تکثیر آنها (Lipophilic Yeasts) است (۱). مالاسزیاها در حال عادی کومنسال‌های بی آزار پوست بوده ولی در شرایط خاصی حالت تهاجمی به خود گرفته و بیماری‌زا می‌شود. مشهورترین بیماری ناشی از مالاسزیاها عفونت پوستی شایعی تحت عنوان پیتریازیس ورسیکالر (Pityriasis Versicolor) است که به صورت لکه‌های تغییر رنگ یافته کوچک و بزرگ، بیشتر در نواحی سینه، پشت، شانه‌ها و گردن ظاهر می‌شود. مالاسزیاها از عوامل فولیکولیت مالاسزیایی (*Malassezia* Folliculitis) بوده که به ظاهر در ایجاد بیماری‌های پوستی دیگری مثل درماتیت شوره‌ای (Seborrheic Dermatitis)، درماتیت آتوپیک (Atopic Dermatitis) و پسوریازیس (Pseoriasis) نیز نقش دارند (۴-۲). در این بیماری‌ها بین بهبودی حاصل از تجویز داروهای ضد قارچی و کاهش جمعیت مالاسزیاها از یک سو و برگشت بیماری با افزایش جمعیت از سوی دیگر ارتباط مستقیمی مشاهده شده است (۵). با این وجود مالاسزیاها هنوز به عنوان علت قطعی این بیماری‌ها پذیرفته نشده‌اند. بر اساس گزارش اخیر، مواردی از عفونت‌های سیستمیک خطرناک مثل سپتی‌سمی و پرتونیت به ویژه در نوزادان نارس و بالغین که سیستم دفاعی را دچار مشکلات شدید کرده است (۶، ۷).

جنس مالاسزیا در شاخهٔ بازیدیومیکوتا (Basidiomycota) و در خانواده کریپتوکوکاسه (Cryptococcaceae) قرار می‌گیرد. این جنس اولین بار در سال ۱۸۴۶ به عنوان علت بیماری پیتریازیس ورسیکالر کشف و تحت عنوان *Pityrosporum* نام‌گذاری شد و گونه‌های *P.orbicular*، *P. ovale* و *P. pachydermatis* در این جنس توصیف گردید. سپس پیتیروسپوروم به مالاسزیا تغییر نام داده و در سال ۱۹۹۰گونه چهارمی تحت عنوان *M. sympodialis* اضافه گردید (۸).

به دنبال دست‌یابی بشر به تکنولوژی‌های مولکولی به ویژه در مورد روش‌های مبتنی بر DNA، در سال ۱۹۹۵ گیلوت و گهو (۹)

Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس مطالعات ژنتیکی از جمله درصد مولار G+C در DNA و آنالیز توالی‌های RNA ی ریبوزومی در کنار مورفولوژی و فیزیولوژی قارچ‌ها، ۷ گونه مالاسزیا شامل *M. pachydermatis*، *M. furfur*، *M. restricta*، *M. slooffiae*، *M. globosa*، *M. sympodialis*، و *M. obtusa* توصیف و پذیرفته شد. در سال‌های اخیر بر اساس داده‌های مولکولی ۴ گونه جدید تحت عنوان M. nana (۱۰)، *M. dermatis* (۱۱)، *M. japonica* (۱۲)، *M. yamatoensis* (۱۳) به جمع مالاسزیاها اضافه شد که در کل ۱۱ گونه مالاسزیا شناسایی و پذیرفته شده است.

گزارش حاضر بر اساس توالی اسیدهای نوکلئیک ناحیه 26S rDNA که مبنای توصیف گونه‌های جدید است (۱۳-۹) و نیز توالی ناحیه Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) که آن نیز مارکر مهمی برای افتراق گونه‌هاست، ایزوله جدیدی از این جنس را معرفی می‌نماید. تفاوت‌های مولکولی شاخص این ایزوله جدید که برای اولین بار در جهان از ایران جداسازی می‌شود پس از تکمیل و توصیف سایر اطلاعات مورفولوژیک و فیزیولوژیک معرف گونه‌ای جدید می‌شود.

گزارش مورد

جداسازی مخمر

در طی مطالعه‌ای که بر فلور مالاسزیایی حیوانات اهلی انجام می‌شد، نمونه‌های پوسته و سوآب روی محیط تغییر یافته MLAN (Leeming and Notman) (۱۴) شامل پپتون (۱درصد)، گلوکز (۱درصد)، عصاره مخمر (۰/۲درصد)، صفراوی گاوی (۰/۸درصد)، گلیسرول (۱درصد)، گلیسرول مونواستائارات (۰/۰۵درصد)، توین ۶۰ (۰/۵درصد)، روغن زیتون (۲درصد) و آگار (۱/۵درصد) کشت داده شد. از بین نمونه‌های یکی از هامسترهای مورد مطالعه، مخمری جدا شد که الگوی RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) آن با مالاسزیاهایی که تا به حال شناسایی شده‌اند (۱۵)، تفاوت داشت و همین تفاوت‌ها موجب مطالعات بیشتر بر روی آن گردید.

استخراج DNAی ژنومی از کلونی مخمری

مطابق روشی که توضیح داده شد (۱۶) یک لوپ باکتریولوژی (حدود ۵ میلی‌متر مکعب) ازکلونی برداشته و به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اپندرف منتقل کرده و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس EDTA (pH 8)، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۱درصد SDS، ۲درصد Triton X-100، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل کلروفرم (۱:۱) و حدود ۲۰۰ میکرولیتر پرل‌های شیشه‌ای (glass-beads) به قطر ۱ میلی‌متر اضافه گردید و مدت ۳ دقیقه با دست به شدت تکان داده شد. آن گاه ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد پس از سانتریفیوژ مجدد و انتقال مایع رویی به تیوب جدید مقدار ۱ حجم ایزوپروپانول سرد و ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار (pH= ۵/۲) اضافه کرده و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در ۲۰- درجه سانتی‌گراد، مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در نهایت پس از شست‌وشوی رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه در ۵۰ میکرولیتر آب حل گردید و تا زمان لازم در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

با استفاده از دو جفت پرایمر PCR انجام شده جفت پرایمر اول (Mal R: 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG-3') و (Mal F: 5'-TAACAAGGATCCCCCTAGTA-3') که در مطالعات قبلی مولف طراحی شده بود (۱۵)، جهت تقویت قطعه D1-D2 موجود درناحیه 26S مربوط به DNAی ریبوزومی مورد استفاده قرار گرفت وجفت پرایمر دوم (18SF1: 5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3') و (58SR1: 5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3') که از گزارش ماکیمورا و همکاران (۱۷) گرفته شد جهت تقویت ناحیه ITS1 مندرج بین قطعات 5.8S و 18S مربوط به DNAی ریبوزومی به کار رفت. برای انجام PCR یک میکرولیتر از DNAی استخراج شده به ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر (۰/۵ میکرومولار) از هر کدام از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر (۲/۵ واحد) آنزیم *Taq* DNA polymer-ase و ۰/۵ میکرولیتر (۲۰۰میکرومولار) dNTPs (نوکلئوتیدهای T G، C، و A) اضافه گردید و حجم نهایی با آب مقطر استریل به۵۰ میکرولیتر رسانده شد. برنامه PCR در هر دو واکنش PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ سیکل و ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه یک سیکل بود.

RFLP

به منظور شناسایی اولیه گونه مالاسزیای جدا شده، با استفاده از پروفیلی که از قبل گزارش شده است (۱۵)، اقدام به هضم اندونوکلئازی محصولات PCR مربوط به ناحیه 26S گردید. به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر آنزیم *Cfo*I و ۲/۵ میکرولیتر بافر مربوطه مخلوط و آب مقطر تا حجم نهایی ۲۵میکرولیتر اضافه گردیده و مدت۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

الکتروفورز

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت یک ساعت و محصولات RFLP روی ژل آگارز به مدت ۲ ساعت الکتروفورز گردید. بافر TBE (۰/۰۹ مولار تریس، ۰/۰۹ مولار اسید بوریک و ۲ میلی‌مولار EDTA، pH= ۳/۸) جهت ساخت ژل و پر کردن تانک به کار رفت. نمونه‌ها به کمک جریان الکتریسیته مستقیم با ولتاژ ۱۰-۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر طول ژل الکتروفورز گردید و مدت ۲۰ دقیقه با رنگ اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی و با طول موج ۳۱۲ نانومتر و با استفاده از ترانس الومیناتور مشاهده و به طریق دیجیتال عکس‌برداری شد.

تعیین توالی (Sequencing)

برای تعیین توالی ناحیه 26S از دو پرایمر رفت و برگشت و برای تعیین توالی ناحیه ITS1 فقط از پرایمر رفت استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از سیستم Prism-ABI تعیین توالی گردید.

آنالیز کامپیوتری داده‌ها

داده‌های تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Blast با

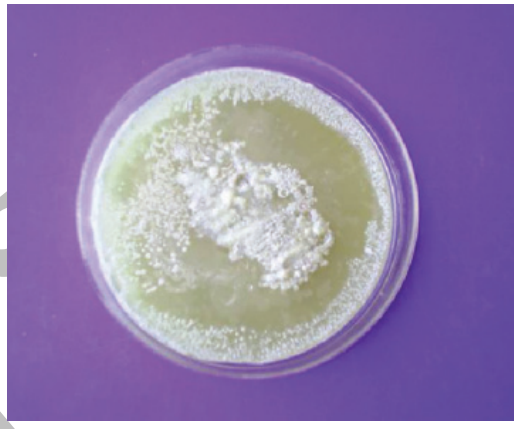
Archive of SID

www.SID.ir

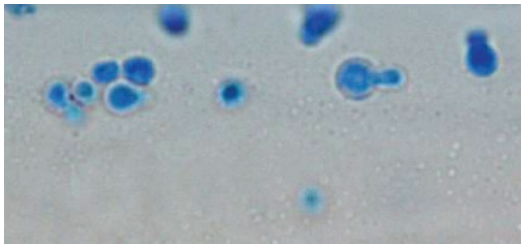
سایرداده‌های مندرج در بانک ژن مربوط به مالاسزیاها و سایر میکرو ارگانیسم‌ها مقایسه شد. برای مقایسه سکانس‌های مربوط به مالاسزیاهای مختلف از نرم‌افزارهای DNASIS و ClastalW نیزاستفاده شد.

یافته‌ها

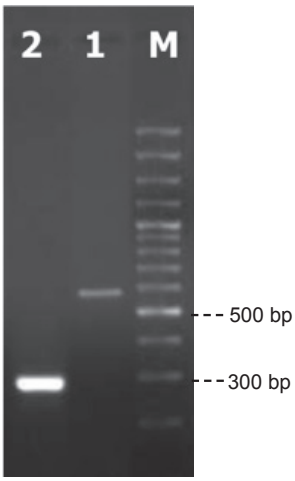
کلونی‌های رشد یافته روی محیط چربی‌دار MLAN (شکل ۱) و نیز مورفولوژی میکروسکوپی سلول‌های مخمری کلونی (شکل ۲) حکایت از وجود مخمرهایی ازجنس مالاسزیا بود.



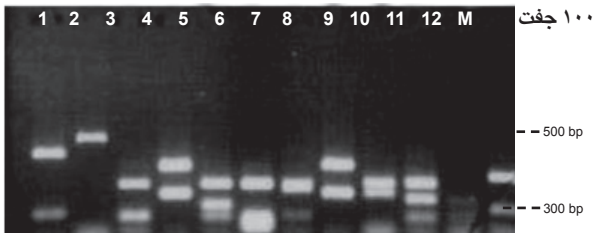
شکل ۱: کلونی‌های ایزوله جدید مالاسزیا رشد یافته روی محیط تغییر یافته Leeming and Notman



شکل ۲: مورفولوژی میکروسکوپی سلول‌های مخمری ایزوله جدید مالاسزیا



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR نواحی 26SrDNA D1/D2 (ردیف ۱) و ITS1 (ردیف ۲) مربوط به ایزوله جدید. ردیف M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت



شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد پس از برش با آنزیم *CfoI*. چاهک‌های ۱ تا ۱۲ به ترتیب: مالاسزیا گلوبوزا، م. رستریکتا، م. فورفور، م. سمپودیالیس، م. ابتوسا، م. اسلوفیه، م. ژاپونیکا، م. درماتیس، م. پاکی درماتیس، م. نانا، م. یاماتوئنسیس، مالاسزیای تازه کشف شده و چاهک M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. ملاحظه می‌شود که الگوی الکتروفورتیک مالاسزیای جدید (ردیف ۱۲) به وضوح با بقیه تفاوت دارد.

این موضوع اولین دلیل جدید بودن ایزوله بود و باعث کنکاش بیشتر و در نهایت تعیین توالی کامل گردید. توالی مزبور در زیر دیده می‌شود:

ANANTTGNAGCTGGCGCCTCCGGCGTCCGCGTT-
GTAATCTCGAGACGTGTTTTCCGTGCGGCACTGT-
GGACAAGTTCTCTGGAAAGGGACATCGTAGAGGGT-
GAAAATCCCGTACTTGCCACGGCTGAACCGTGCTTTGCGA-
TACACGCTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCT-
CAAAGTGGGTGGTAGACTCCATCTAAAGCTAAATATCG-
GGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAA-
GATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAGTACGT-
GAAATTGTCGAAAGGGAAGCGCTTGGAGTTAGCCAT-
GCCGCTCGAGATTCAGCCTTACGGTGTACTTCTCGGGTAG-
CAAGTCAGCATTGGTTTGTGCCGCTGGAGAAGGGCGT-
GGGGAATGTGGCACTTCGGTGTGTTATAGCCCCAT-
GCTGGATACAGCGGCGCGGATCAAGGAACGCAG-
CACGCCTTGTGGCGGGTCTTCGGACACCTTCGTGCTTAG-
GANNNNNNNCGTAATA

پس ازآنالیز توالی‌ها مشخص شد که این ایزوله با سایر مالاسزیاها به میزان قابل توجهی تفاوت دارد. شکل ۵ درخت فیلوژنیک (Phylogentic tree) را که پس از مقایسه توالی ناحیه 26S در مالاسزیاهای مختلف به کمک نرم‌افزار DNAsis رسم شده است، نشان می‌دهد.

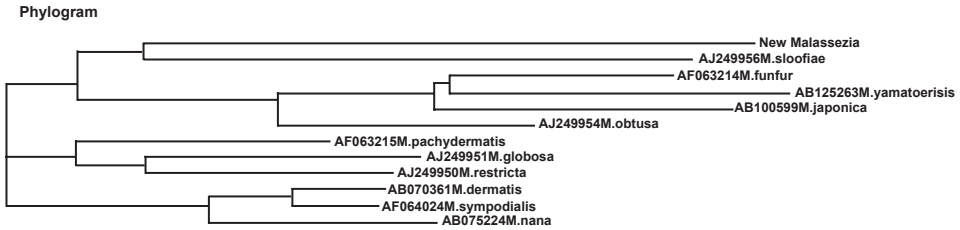
مطابق این درخت مالاسزیای جدید کشف شده طی این مطالعه در کنار *M. sloofiea* روی یک شاخه قرار دارد. به منظور حصول اطمینان بیشتر در رابطه با جدید بودن ایزوله جدا شده ناحیه ITS1 با استفاده ازجفت پرایمر مربوطه، PCR و تعیین توالی صورت گرفت. پس از الکتروفورز محصول PCR یک باند به وزن حدود ۲۸۰ جفت باز مشاهده گردید (شکل ۳). توالی ناحیه ITS1 در زیر درج می‌شود:

GNGCTGNGGNAGATGTGAGATGGCGGGCTTTC-
GAGCCCGCACGCACTGTCCACCTCACCTCCACACAGATC-
CAAACCCCTGTGCACACGCTCTCTCTGGGCGCGCG-
GAAATGCCGCAAGCCTGGGGGGAAGAATGAAACAC-
CTAGCCAGTTGAATGAACGTTAGTGTGTTGGATCG-
TAACGACCAACGAAGAAAAACACAACTTTCGACAACG-
GATCTCTAGGTTCTCCCATCGATGAAGA

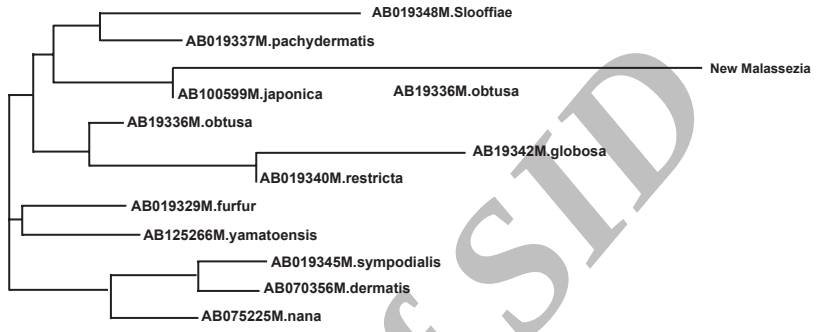
شکل ۶ درخت فیلوژنیک را برای درک جایگاه مالاسزیای جدید با توجه به مقایسه توالی ناحیه ITS در مالاسزیاهای مختلف، نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵: فایلوگرام ناحیه D1-D2 گونه‌های مختلف مالاسزیا و جایگاه مالاسزیای جدید در بین آنها



شکل ۶: فایلوگرام ناحیه ITS1 گونه‌های مختلف مالاسزیا و جایگاه مالاسزیای جدید در بین آنها

بحث

از سال ۱۹۹۵ که ملاک طبقه‌بندی مخمرهای چربی پوست متعلق به جنس مالاسزیا از شاخص‌های فیزیولوژیک و مرفولوژیک به مارکرهای ژنوتیپی تغییر نمود و ۳ گونه مالاسزیا به ۷ گونه توسعه پیدا کرد (۹). تا کنون ۴ گونه جدید به آنها اضافه شده و در جمع ۱۱ گونه مالاسزیا توصیف و پذیرفته شده است (۱۳-۱۰).

کمپلکس ژنی DNAی ریبوزومی (rDNA) دارای بخش‌های مختلف محافظت شده (Conserved) و متغیر (Variable) است که بسته به اهداف تشخیصی یا تحقیقی می‌تواند برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها در حد جنس و گونه یا فوق جنس و زیرگونه به کار رود (۱۸). این نواحی، مارکرهای مناسبی برای تعیین جایگاه تاکسونومیک بیشتر قارچ‌ها از جمله مالاسزیاها می‌باشند. چنانچه گویلوت (۹) اولین بار با استفاده از ترادف همین ناحیه گونه‌های مالاسزیا را طبقه‌بندی مجدد نمود سپس ۴ گونه جدید مالاسزیا شامل *M. japonica*، *M. dermatis*، *M. nana* و *M. yamatoensis* با استفاده از تعیین توالی نواحی D1-D2-26S و بعضا ITS1 معرفی کرد (۱۴-۱۰).

از پیش یک سیستم ساده و سر راست PCR-RFLP مبتنی بر توالی ناحیه D1-D2 26S rDNA برای شناسایی ۱۱ گونه مالاسزیا معرفی نمودیم و در همان گزارش امکان توسعه این سیستم برای شناسایی و تعیین هویت گونه‌های جدید را مطرح کردیم (۱۵). خوشبختانه سیستم مزبور به خوبی گونه جدید را به ما معرفی نمود، به طوری که در حین شناسایی گونه‌های رایج موجود در پوست و مخاط حیوانات، در اولین برخورد با الگوی تازه‌ای از RFLP و پس از آگاهی و اطمینان از متفاوت بودن آن الگو با سایر مالاسزیاها (شکل ۴)، امکان کشف ایزوله‌ای جدید مطرح شد. این مسئله با تعیین توالی ناحیه D1-D2 موجود در ناحیه 26S rDNA و نیز ناحیه ITS1 به خوبی تایید و تقویت گردید. با آنالیز توالی 26S با استفاده از نرم‌افزار DNASIS معلوم شد که اندازه محصولات RFLP به طور دقیق معادل ۲۹۷، ۱۴۳، ۷۰ و ۶۱ جفت باز می‌باشد. معیار پایه و پذیرفته شده طبقه‌بندی و تاکسونومی گونه‌های مالاسزیا ترادف قطعه D1/D2 در ناحیه 26S rDNA می‌باشد (۱۳-۹)، به همین دلیل نمونه جدا شده طی این تحقیق، ایزوله‌ای جدید تلقی می‌شود. با این وجود برای معرفی و نام‌گذاری یک ارگانیسم به عنوان گونه (Species) لازم است به طور دقیق مشخصات مورفولوژیک و فیزیولوژیک آن بررسی و توصیف شده و آنگاه به مراکز بین‌المللی نگهداری میکروارگانیسم‌ها ارسال و ثبت گردد. این مطالعات در هر حال انجام بوده و مستلزم زمان و آزمون‌های بیشتر است.

با توجه به الگوی جدیدی که در نتایج حاصل از PCR-RFLP مشاهده شد و نواحی D1-D2 و نیز ITS1 موجود در کمپلکس ژنی rDNA، مارکرهای مناسبی برای تعیین جایگاه تاکسونومیک مالاسزیاها می‌باشند و در طی این تحقیق، این نواحی در مالاسزیای جدا شده از خوکچه هندی دارای توالی نوکلئوتیدی منحصر به فرد بوده، این نمونه به عنوان یک ایزوله‌ای جدید معرفی می‌شود. معرفی و نام‌گذاری این ایزوله به عنوان گونه (Species)، مستلزم توصیف مشخصات مورفولوژیک و فیزیولوژیک آن و نیز ارسال و ثبت آن به مراکز بین‌المللی نگهداری میکروارگانیسم‌هاست.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با استفاده از اعتبارات دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است. از کمک‌های خانم نیلوفر جلالی‌زند و آقای رضا جعفری صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Ashbee HR. Update on the genus Malassezia, Med Mycol. 2007; 45(4): 287-303.
2. Chen TA, Hill PB. The biology of Malassezia organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. Vet Dermatol. 2005; 16(1): 4-26.
3. Gupta AK, Batra R, Boekhout T. Skin diseases associated with Malassezia species. J Am Acad of Dermatol. 2004; 51(5): 785-789.
4. Crespo Erchiga V, Florencio VD. Malassezia species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis. 2002; 15(2): 133-142.
5. Faergemann J. Atopic dermatitis and fungi. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 545-563.
6. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. Chryssanthou E, Broberger U, Petrini B. Malassezia pachydermatis fungemia in a neonatal intensive care unit. Acta Paediatr. 2001; 90(3): 323-327.
7. Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with Malassezia species. Clin Microbi Rev. 2002; 15(1): 1-27.
8. Simmons RB, Guého E. A new species of Malassezia. Mycol Res. 199b; 94: 1146-1149.
9. Guillot J, Guého E. The diversity of Malassezia yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie Van Leeuwenhoek. 1995; 67(3): 297-314.
10. Hirai A, Kano R, Makimura K. Malassezia nana sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int J Sys Evol Microbiol. 2004; 54: 623-662.
11. Sugita T, Takashima M, Shinoda T. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol. 2003; 40(4): 1363-1367.
12. Sugita T, Takashima M, Kodama M. Description of a New Yeast Species, Malassezia japonica, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J Clin Microbiol. 2003; 41(10): 4695-4699.
13. Sugita T, Tajima M, Takashima M. A new yeast, Malassezia yamatoensis, Isolated from a Patient with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in patients and Healthy Subjects. Microbiol Immunol. 2004; 48(8): 579-583.
14. Leeming JP, Notman FH, Holland KT. The distribution and ecology of Malassezia furfur and cutaneous bacteria on human skin. J Appl Bacteriol. 1989; 67(1): 47-52.
15. 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. J Microbiol Methods. 2005; 61(2): 281-284.
16. Yamada Y, Makimura K, Merhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis. 2002; 55(4): 122-125.
17. 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. J Med Microbiol. 2000; 49(1): 29-35.
18. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol. 2002; 40(1): 87-109.

Archive of SID

www.SID.ir

Case Report

A New Isolate of the Genus *Malassezia* Based on the Sequence Analysis of 26S and ITS1 in Ribosomal DNA

Hossein Mirhendi, Ph.D.[1]*, Ali Zia, Ph.D.[2], Kuichi Makimura, M.D., Ph.D.[3]

1. Medical Parasitology and Mycology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Researches, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
2. Azad University, Khorasgan, Isfahan, Iran
3. Institute of Medical Mycology and Genome Research Center, Teikyo University, Tokyo, Japan

**** Corresponding Address: P.O.Box: 14155-6446, Medical Parasitology and Mycology Department, School of Public Health and Institute of Public Health Researches, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN***
Email: mirhendi@tums.ac.ir

Received: 21/May/2008, Accepted: 12/Nov/2008

Abstract

Malassezia species considered to be the etiological agents of pityriasis versicolor and *Malassezia* follicolitis in humans. Recently, on the basis of molecular data, four new species were added to the genus. In total, 11 species have been described and accepted so far. In this study we describe a new isolate of *Malassezia* based on the nucleotide sequence of 26SrDNA and ITS1 regions, as the accepted critical markers for description of the species.

The yeast was isolated from a hamster. Two primer pairs, one for amplification of D1/D2-26Sr DNA and another for the ITS1 region were used in PCR. The PCR products were sequenced and analyzed to compare with other similar sequences which are already deposited in the GenBank. The 26SrDNA PCR product was also digested with the restriction enzyme CfoI.

Malassezia-specific universal primer pairs successfully amplified the 26srDNA and ITS1 regions of the new isolate, providing a single PCR product of about 580 and 280 base pairs, respectively. After digestion of the 26s PCR product with the enzyme CfoI, a unique and different RFLP pattern was observed. Sequence analysis of D1/D226s and ITS1 regions were compared with the same regions in all already described *Malassezia* species, which implied a different and unique new sequences. The phylogenetic tree of both regions showed that the isolate could be a different *Malassezia* isolate.

Regarding the new RFLP pattern of D1/D226SrDBA and the unique nucleotide sequence of both D1/D2 26SrDNA and ITS1 regions, we propose the isolate to be a new *Malassezia*.

Keywords: *Malassezia*, Ribosomal DNA, Classification

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 244-249

Archive of SID

www.SID.ir