Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۶ مهر و آبان سال ۱۳۸۷ (۶۲-۵۱)

تعیین گونه مالاسزیا های جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیر یازیس ورسیکالر و درماتیت سبوروئیک، با روش PCR-RFLP

طاهره شکوهی* زهره حاج حیدری** آزیتا بذرگر*** سید محمد باقر هاشمی سوته****
محمد تقی هدایتی ***** سید رضا عقیلی ****** پروانه افشار*******

چکیده

سابقه و هدف: اعضای جنس مالاسزیا مخمرهای چربی دوست هستند که فلور طبیعی پوست انسان بوده و با تعدادی بیماریهای پوست مرتبط می باشند. این ارگانیسم در شرایط خاصی مسبب بیماری پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبوروئیک می باشد. گونه های مالاسزیا را می توان از طریق خصوصیات مرفولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی کرد ولی این روشهای فنوتیپی معمولا زمان بر و فاقد قدرت تمایز کافی است؛ لذا روش های مولکولی شناسائی سریع تر و صحیح تری را فراهم می کند. هدف از این مطالعه تعیین گونه های مالاسزیا جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر،درماتیت سبوروئیک،درماتیت اتوپیک با روش PCR –RFLP[1]است.

در این مطالعه ناحیه ITS1 از DNAی ریبوزومی جهت تقویت در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه پلی مرفیسم موجود در قطعات تقویت شده به وسیله روش RFLP با استفاده از آنزیم های *Cfo*I و *Bs*+F5I و ایجاد قطعات متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به الگوهای مختلف DNA های هضم شده گونه های مالاسزیا شناسائی شد.

مواد و روش ها: جمعا ۶۳ گونه مالاسزیا ۳۰ استرین جدا شده از بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالرو ۳۳ استرین جدا شده از بیماران مبتلا به درماتیت سبوروئیک مورد مطالعه قرار گرفت.جهت بررسی مولکولی، DNA ژنومی مخمرهای مالاسزیا جدا شده از محیط کشت استخراج گردید. ناحیه ITS1(بین 18S و5.8S) از DNAی ریبوزومی بوسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) تقویت گردید. تعدادی از محصولات با پرایمر ITS1 (forward) تعیین توالی شد و با جستجو در بانک ژنی گونه مالاسزیا تعیین گردید. آنگاه پلی مرفیسم موجود در قطعات تقویت شده به وسیله روش RFLP با استفاده از آنزیم های *Cfo*I و *Bs*+F5I و ایجاد قطعات متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به الگوهای مختلف DNA های هضم شده گونه های مالاسزیا شناسائی شد .

یافته ها: از ۳۷ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر (۲۰ زن ،۱۷ مرد) که محدوده ی سنی آنها بین ۶۴-۲ سال بود، در ۳۰ مورد (۸۱/۱ درصد) کلنی مالاسزیا روی محیط کشت رشد کرد و مالاسزیا گلوبوزا از ۱۶ بیمار(۵۳/۳درصد) ،مالاسزیا فور فور از ۱۲ بیمار ۴۰درصد و مالاسزیا سیمپودیالیس از ۲ بیمار(۶/۷ درصد) جدا شد. از ۴۱ بیمار مبتلا به درماتیت سبوروئیک (۲۲ زن ،۱۹ مرد) که محدوده ی سنی آنها بین ۵۲-۱ سال بود. در ۳۳ مورد (۸۰/۵ درصد) کلنی مالاسزیا روی محیط کشت رشد کردو مالاسزیا فور فور از ۱۴ بیمار(۴۲/۴ درصد) ،مالاسزیا گلوبوزا از ۱۳ بیمار(۳۹/۴ درصد) ،مالاسزیا رستریکتا از ۵ بیمار(۱۵/۲ درصد) و مالاسزیا سیمپودیالیس از یک بیمار(۳ درصد) جدا شد. نتایج به دست آمده از آزمایش PCR- RFLP با نتایج به دست آمده از تعیین توالی نمونه هایDNA وخصوصیات مرفولوژیک و بیوشیمیایی مطابقت کامل داشت. توالی های بررسی شده از ۹۳ تا ۹۹درصدبا توالی رفرانس خود در بانک ژنی شباهت داشت.

استنتاج: گونه های غالب جدا شده در بیماران پیتیریازیس ورسیکالر به ترتیب فراوانی مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا فور فور و گونه های غالب جدا شده در بیماران درماتیت سبوروئیک به ترتیب فراوانی مالاسزیا فورفور و مالاسزیا گلوبوزا بودند. همچنین الگوی حاصل از هضم آنزیمی قطعه ITS1 در مورد مالاسزیاهای بررسی شده روشی ساده ، سریع و تکرار پذیر برای شناسائی گونه های مهم مالاسزیا می باشد اماجهت اطمینان، توصیه می شود این روش در مورد بیماران بیشتری مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مالاسزیا ، پیتیر یازیس ورسیکالر، درماتیت سبوروئیک، PCR-RFLP ،ایران

این تحقیق طی شماره ۴۶-۸۵ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

مولف مسئول: دکتر طاهره شکوهی- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشکاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
Email: shokohi.tahereh@gmail.com

* دکترای قارچ شناسی پزشکی، استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** متخصص پوست، دانشیاردانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** کارشناسی ارشد قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**** دکترای ژنتیک، استادیار مرکز تحقیقات تالاسمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
***** دکترای قارچ شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران
****** کارشناسی ارشد قارچ شناسی پزشکی، مربی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
******* کارشناس ارشد آزمایشگاه رفرانس دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۷/۲/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۴/۱۸ تاریخ تصویب: ۸۷/۸/۸

[1] - Polymerase Chainrection- Restriction Fracment Length Polymorphhism

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مخمرهای مالاسزیا متعلق به شاخهٔ بازیدیو مایکوتا می باشند و در خانواده کریپتوکوکاسه قرار دارند(۱). این قارچ ها که در ابتدا تحت عنوان پیتیروسپوروم نامیده می شدند، در سال ۱۹۸۴ در جنس مالاسزیا قرار گرفتند(۲). اعضای جنس مالاسزیا مخمرهای چربی دوست هستند که فلور طبیعی پوست حیوانات خونگرم از جمله انسان به شمار می روند. این ارگانیسم ها در شرایط خاصی عامل بیماری پیتیریازیس ورسیکالر می باشند. این بیماری عارضه مزمن و آرام لایه شاخی پوست است که با ایجاد ضایعات ماکولر پوسته دار صاف یا کمی برجسته مشخص می شود (۳،۱). ضایعات به رنگ های مختلف روشن ترتا تیره تر از پوست زمینه دیده می شوند و در نقاطی از بدن بیشترندکه غنی از غدد سباسه باشد (۴).

درماتیت سبوروئیک بیماری پوست مزمن،التهابی پوسته ریزی دهنده می باشد که ضایعات آن منتشر، چرب و توأم با شوره و خارش بوده و در پوست سر و صورت و قسمت های فوقانی تنه که غنی از غدد سباسه هستند مشاهده می گردند (۴). اخیراً جنس مالاسزیا به عنوان یک عامل مهم در اتیولوژی در ماتیت سبوروئیک مورد توجه قرار گرفته است (۸-۴).

در ماتیت اتوپیک نوعی بیماری پوستی التهابی، عود کننده و مزمن است که به وسیله زخم های پوستی اگزمائی و خارش دار مشخص می شوند. گزارشات متعددی مبنی بر نقش گونه های مالاسزیا در تشدید ضایعات در ماتیت اتوپیک وجود دارد (۱۱-۹).

با کمک روش های مختلف تشخیص گونه های مالاسزیا، مانند استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و روش های مولکولی می توان به وجود آنها و هم چنین ارتباط آنها با بیماریهای مختلف پی برد. با توجه به توزیع متفاوت گونه های مالاسزیا در نواحی مختلف جغرافیایی و همچنین حساسیت متفاوت گونه های مختلف به داروهای ضد قارچی، با شناسائی دقیق گونه های مالاسزیا، درمان بیماریهای مرتبط با آن تسهیل خواهد شد(۱۲).

حساس بودن نسبت به تغییر شرایط محیطی و کند رشد بودن برخی گونه های مالاسزیا مانند گلوبوزا، اوبتوزا و بخصوص رستریکتا، تشابه زیاد نتایج آزمایشات فیزیولوژیک و مرفولوژیک بین برخی گونه ها مانند مالاسزیا فورفور، سمپودیالیس واسلوفیه و همچنین تابعیت روش های فیزیولوژیک از شرایط محیطی، نوع مواد شیمیائی، ترکیبات محیط کشت و حتی تخصص خود آزمایش کننده باعث محدودیت در استفاده از روش های مرفولوژیک و فیزیولوژیک پیشنهادی جهت تشخیص گونه های مالاسزیا شده است (۱۳). از این رو ارائه روشهای کاملاً حساس با تکرار پذیری بالا و نیاز به حداقل میزان نمونه به منظور تشخیص صحیح این مخمرها ضروری می باشد و برای این امر روشهای مولکولی مناسب هستند زیرا این روشها بسیار دقیق، حساس و سریع بوده و بر خلاف روشهای فنوتیپی که تحت شرایط محیطی قرار می گیرند از تکرارپذیری بالائی برخوردارند. از میان روشهای مولکولی روش PCR-RFLP توانائی تعیین گونه های مالاسزیا را با دقت و صحت بالا مطابق باتاکسونومی جدید دارد که این مسئله با استرین های استاندارد مالاسزیا اثبات شده است. هم چنین نتیجه به دست آمده از PCR-RFLP قابل مقایسه با نتیجه PCR به همراه تعیین توالی می باشد. این روش قابل استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیکی و حتی آزمایشات روتین می باشد (۱۳).

این بررسی با هدف تعیین گونه های مالاسزیا جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبوروئیک، به روش PCR-RFLP طراحی شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

تحقیق یک مطالعه به روش توصیفی است . نمونه ها به طور غیرتصادفی مستمر از بیماران مراجعه کننده بیمارستان بوعلی و آزمایشگاه رفرانس ساری در سال ۸۶ – ۸۵ جمع آوری گردید .

انتخاب بیماران :

در این بررسی بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبوروئیک بعد از تأیید بیماری توسط متخصصین پوست بیمارستان بوعلی ساری و همچنین بیماران ارجاعی متخصصان پوست به بخش قارچ شناسی آزمایشگاه رفرانس ساری پس از اخذ رضایت جهت نمونه گیری انتخاب شدند .

نمونه گیری :

نمونه گیری با روش تراشیدن پوست (Scraping) سطح ضایعات بیماران به وسیله اسکالپل انجام می گرفت . تراشه های پوستی با استفاده از با پتاس ۱۰درصدو رنگ آمیزی متیلن بلو مورد بررسی میکروسکوپی مستقیم قرار می گرفتند.

کشت :

مخمرهای مالاسزیا به جز مالاسزیا پاکی درماتیس، لیپوفیل بوده و برای رشد به چربی های اگزوژن نیاز دارند. بنابراین برای کشت آنها باید از محیط های کشت غنی از اسیدهای چرب با زنجیره های بلند استفاده نمود . با توجه به مطالعات گذشته محیط کشت لیمینگ نوتمن (LNA – Leeming and Notman ager) برای این منظور انتخاب شد(۱۵) و نمونه های بیماران روی محیط کشت مذکور کشت داده شد .

DNA Extraction با روش glass bead:

ابتدا کشت خالص از هر ایزوله مالاسزیای تهیه و در ۳۰°C به مدت ۲–۱ هفته انکوبه شد. DNA با استفاده از روش فروپاشی گلس بید، جدا شده بود (۱۴، ۱۶، ۱۷) .

اولیگونوکلئوتید:

پرایمر های اولیگونوکلئوتیدبر اساس تحقیق ماکیمورا و همکاران ۲۰۰۰(۱۷) به منظور تقویت ژن ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی طراحی گردید. توالی پرایمرForward (18SF1) شامل: (5′-AGG TTT CCG TAG GTG AAC CT-3′) توالی پرایمر Reverse (5.8SR1) شامل: (5′-TTC GCT GCG TTC TTC ATC GA-3′)بود.

PCR :

PCR در یک حجم نهایی 50µl انجام گردید، شامل: 2µl از DNA الگو، 5µl از PCR×10 buffer، ، 1µl داکسی نوکلئوزید تری فسفات (10mM، محصول شرکت BIRON)، 2 µl از هر پرایمر (با غلظت 10 µM، محصول شرکت تولیدی تحقیقاتی سیناژن))، 3 µl از MgCl2 (25 mM)، 0.4 µl از Taq DNA polymerase (250 U، محصول Roche). واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر (مدل Thermal cycler techne-TC- 312) انجام گردید. سیکل های گرمایی بدین شرح بود: دناتوره ابتدائی °C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، که با ۳۵ سیکل به صورت زیر دنبال می شد: (دناتوره:°C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه) (اتصال: °C ۵۲ به مدت ۱ دقیقه) (تکثیر: °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه)؛ و یک مرحله تکثیر انتهایی °C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه.

مقدار µl 8 از هر محصول PCR در یک ژل آگارز ۱/۵درصدو بافر 1×TBE (Tris base، Boric acid، EDTA pH:8) الکتروفورز شده بود. یک (100 bp) DNA Marker (محصول شرکت BIRON) همراه با نمونه ها برای تعیین اندازه باندها همراه شده بود. سپس ژل با اتیدیوم برماید (0.5 µg/ml) رنگ آمیزی و تصویر با دستگاه UV doc (Gel Documentation and Analysis; Model: GAS 9000/9010: version 12; Cambridge, UK) تهیه شد(۱۸).

www.SID.ir

تعیین توالی محصولات PCR :

تخلیص محصولات با روش (Column based purification Kit (Millipore) using vacuum for filtering) انجام شد. ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی با پرایمرهای 5.8SR1 و18SF1 تعیین توالی گردید. (۱۷).

RFLP :

انتخاب آنزیم بر اساس تعیین توالی های محصولات PCR و با استفاده از نرم افزار CLC free workbench (version 3-0-2) و همچنین بر اساس مطالعه میرهندی و همکاران صورت پذیرفت(۱۴). در این آزمایش عمل هضم آنزیمی بر روی محصولات PCR با استفاده از آنزیم های *Cfo*I و *Bs*+F5I انجام شد.(جدول شماره ۲) واکنش هضم اندونوکلئازی با انکوباسیون ۱۷ میکرولیتراز محصول PCR با ۱۰U از هر آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به مدت ۳ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گرادانجام گردید و محصول در یک ژل آگارز ۲درصدو بافر 1×TBE (Tris base، Boric acid، EDTA pH:8) الکتروفورز شده بود.با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده، پس از مشاهده با دستگاه UV- doc، عکس ها تهیه شد. در الکتروفورز محصولات هضم اندونوکلئازی از مارکر 100bp جهت اندازه گیری باندهای تشکیل شده استفاده گردید(۱۹).

یافته ها

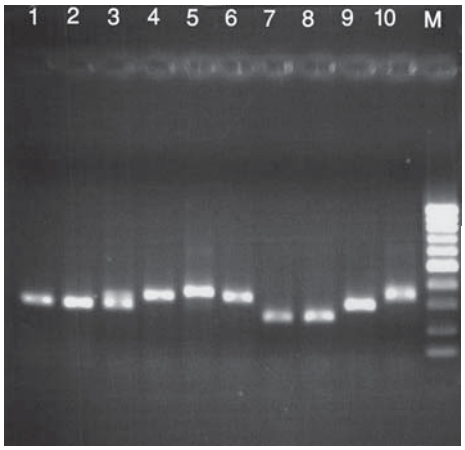
آزمایش مستقیم و کشت:

از تعداد ۳۷ بیمار مبتلا به پیتریازیس ورسیکالر که در آزمایش مستقیم از نظر مالاسزیا مثبت بودند کشت روی محیط لیمینگ نوتمن تغییر یافته به عمل آمد و در ۳۰ مورد (۸۱/۱ درصد) کلنی مالاسزیا رشد کرد.از ۴۱ بیمار مبتلا به درماتیت سبوروئیک در آزمایش مستقیم از نظر مالاسزیا مثبت بودند کشت روی محیط لیمینگ نوتمن تغییر یافته به عمل آمد و در ۳۳ مورد (۰/۵ ۸درصد) کلنی مالاسزیا رشد کرد .

نتایج PCR انجام شده بر روی ایزوله های مالاسزیا :

استخراج DNA روی ۶۳ مخمر مالاسزیای رشد یافته روی محیط کشت انجام شد سپس آزمایش PCR با پرایمرهای (Forward) 18SF1 و(Reverse) 5.8SR بر روی DNA۶۳ مالاسزیای جدا شده انجام گردیده و قطعه هدف (ناحیه ITS1) از DNA ریبوزومی برای کلیه ایزوله ها قطعات متفاوتی به اندازه ۲۲۰ تا ۳۳۰ جفت بازتقویت شد (تصویر شماره۱) .

تصویرشماره۱:الکتروفورز محصولPCR گونه های مهم



مالاسزیا حاصل از تکثیر ناحیهITS1درrDNA
نمونه های ۳و۲و۱ مالاسزیا فورفور ،۶و۵و۴ مالاسزیا گلوبوزا ،۸و۷ مالاسزیا سیمپو دیالیس،۹مالاسزیا رستریکتا ،۱۰ مالاسزیا گلوبوزا ،M مارکرمولکولی ۱۰۰جفت بازی

نتایج تعیین توالی محصولات PCR :

محصولات PCR ۱۰ نمونه مالاسزیا با پرایمر(Forward) 18SF1 و(Reverse) 5.8SR) تعیین توالی شد . نتایج تعیین توالی بعد از تطبیق با DNA های موجود در بانک ژنی با کمک نرم افزار BLAST2 برای ۱۰ محصول

www.SID.ir

Archive of SID

گونـه هـای مالاسـزیا را شناسـایی نمـود .از محـصولات تعیـین تـوالی شـده ۴ گونـه مالاسـزیاگلوبوزا ، ۳ گونـه مالاسزیا فور فور، ۲ گونه مالاسزیا سیمپودیالیس و یـک گونه مالاسزیارستریکتا شناسائی شد . توالی های بررسی شده از ۹۳ تـا ۹۹ درصـد بـا تـوالی خـود در بانـک ژنـی (Gene Bank) شباهت داشتند (جدول شماره ۱) .

جدول شماره ۱ : تعیین گونه های مالاسزیا با استفاده از تعیین توالی ناحیه ITS1 از rDNA

گونه مالاسزیا	اندازه محصول PCR (bp)	درصدsimilarity	Accession no.	شماره نمونه
مالاسزیا فور فور	277	98%	AY743634.1	MB1
مالاسزیا فور فور	261	98%	AB105153	MB2
مالاسزیا فور فور	269	97%	AB105153	MB3
مالاسزیاگلوبوزا	300	93%	AY387132-1	MB4
مالاسزیاگلوبوزا	330	96%	AJ437693-1	MB5
مالاسزیاگلوبوزا	305	93%	AY743630	MB6
مالاسزیارستریکتا	258	99%	AY743638	MB7
مالاسزیارستریکتا	220	99%	AY743638	MB8
مالاسزیا سیمپودیالیس	272	96%	AY743636	MB9
مالاسزیا سیمپودیالیس	314	94%	AY743630	MB10

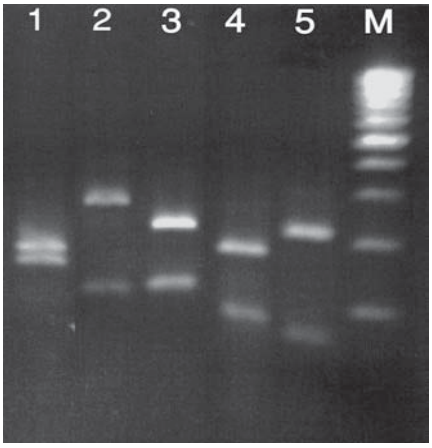
RFLP :

عمل هضم آنزیمـی بـا آنـزیم هـای CfoI و Bs+F5I بـر روی محصولاتPCR صـورت گرفـت. آنـزیم CfoI در مالاسزیافورفور دارای دو محل شکست بود و سـه قطعـه ایجاد نمود. در مالاسزیا سیمپودیالیس دارای یـک محـل شکست بود و دو قطعه ایجاد کرد. این آنزیم فاقد محـل شکـست در مالاسـزیاگلوبوزا و رسـتریکتا بـود بنـابراین اندازه قطعه قبل و بعد از هضم اندونوکلئازی یکسان بود. آنزیم Bs+F5I در مالاسزیا فورفور و مالاسزیا رستریکتا دارای یک محل شکست بود و دو قطعه ایجاد کـرد. ایـن آنـزیم در مالاسـزیا گلوبـوزا دارای دو محـل شکست بود و سه قطعه ایجاد نمود. ولی با توجه به اینکه اندازه یکی از قطعات بسیار کوچک بود (12 جفت بـاز) و در الکتروفورز روی ژل آگارزدیـده نـشد بنـابراین دو قطعه دیده شد. آنزیم Bs+F5I در مالاسزیا سیمپودیالیس فاقد محل شکست بود. (جدول شماره۲ و تصویرشماره ۲).

جـدول شـماره ۲: انـدازه قطعـه ITS1 در مالاسـزیاهای مختلـف قبـل و بعـد از هـضم انـدونوکلئازی بـا آنـزیم هـای CfoI و Bs+F5I

گونه مالاسزیا	اندازه محصول PCR بر حسب جفت باز(bp)	اندازه قطعات بعد از هضم با CfoI (bp)	اندازه قطعات بعد از هضم با Bs+F5I (bp)	٪ Homology	Accession number
مالاسزیا فور فور	۲۶۱	۲۰۳،۳۳،۲۵	۱۵۵،۱۰۶	٪۹۸	AB۱۰۵۱۵۳
مالاسزیاگلوبوزا	۳۳۰	۳۳۰	۲۵۴،۶۴،۱۲	٪۹۶	AJ۴۳۷۶۹۳،۱
مالاسزیاگلوبوزا	۲۲۰	۱۷۲،۴۸	۲۲۰	٪۹۹	AY۷۴۳۶۳۸
مالاسزیارستریکتا	۲۷۲	۲۷۲	۲۰۴،۶۸	٪۹۶	AY۷۴۳۶۳۶

www.SID.ir



تصویر شماره ۲: الکتروفورزمحصول های PCR قطعه ITS1 در گونه های مهم مالاسزیا پس از هضم آنزیمی .
نمونه های ۱،۲،۳پس از هضم با آنزیم BSTF5I به ترتیب : مالاسزیا فورفور،مالاسزیا گلوبوزا ،مالاسزیا رستریکتا . نمونه های ۴،۵بعد از هضم با آنزیم COFI به ترتیب مالاسزیا سیمپودیالیس،مالاسزیا فورفور.Mمارکرمولکولی ۱۰۰جفت بازی

الگوی حاصله د ر مالاسزیاهای مختلف از نظر اندازه آن قدر متفاوت و متمایز بود که بدون ابهام گونه های مالاسزیا شناسائی شدند .

نتایج به این ترتیب بود که در ۳۰ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر مالاسزیاگلوبوزا از ۱۶ بیمار (۵۳/۳درصد) ، مالاسزیافورفور از ۱۲ بیمار(۴۰درصد)، مالاسزیاسیمپودیالیس از ۲ بیمار(۶/۷درصد) جدا شد . در ۳۳ بیمار مبتلا به درماتیت سبوروئیک در ۱۴ بیمار مالاسزیافورفور (۴۲/۴درصد) ، در ۱۳ بیمار مالاسزیاگلوبوزا (۳۹/۴درصد)، در ۵ بیمار مالاسزیارستریکتا (۱۵/۲درصد) و در یک بیمار مالاسزیا سیمپودیالیس (۳درصد) جدا شد (جدول شماره ۳) .

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی بیماران مورد بررسی بر حسب گونه های جدا شده به تفکیک نوع بیماری

بیماری / گونه	پیتیریازیس ورسیکالر		درماتیت سبوروئیک		جمع	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
مالاسزیاگلوبوزا	۵۳/۳	۱۶	۳۹/۴	۱۳	۴۶	۲۹
مالاسزیافورفور	۴۰	۱۲	۲۴/۴	۱۴	۴۱/۳	۲۶
مالاسزیارستریکتا	۰	۰	۱۵/۲	۵	۷/۹	۵
مالاسزیا سیمپودیالیس	۶/۷	۲	۳	۱	۴/۸	۳
سایر گونه ها	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع	۱۰۰	۳۰	۱۰۰	۳۳	۱۰۰	۶۳

بحث

لازم به ذکر است که نتایج PCR-RFLP بدست آمده از نمونه های کلنیکی با نتایج تعیین توالی و خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیک (کاتالاز) وآزمایشات بیوشیمیایی (آزمایشات جذب تویئن و ایجاد شکاف در اسکولین)انطباق کامل داشت.

نقش این مخمر در پاتوژنز برخی بیماری های پوستی برای مدتهای مدیدی در هاله ای از ابهام قرار داشت. بدنبال تغییر تاکسونومی جنس مالاسزیا در سال ۱۹۹۶ ، اهمیت این مخمر در فیزیوپاتولوژی ضایعات پوستی ، مجدداً مورد توجه محققان قرار گرفت . لذا انجام مطالعات مختلف به منظور تجدید نظر در اطلاعات مربوط به اکولوژی و فیزیوپاتولوژی این مخمر

www.SID.ir

Archive of SID

و بررسی ارتباط هر یک از گونه ها با ضایعات پوستی مختلف ضروری به نظر می رسد(۱۳).

در این بررسی به منظور جداسازی و شناسایی گونه مالاسزیاهای از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبوروئیک نمونه گیری بعمل آمد.

در مطالعات مختلف از تکنیک های تراشیدن ، چسب اسکاچ و تماس دادن پلیت (contact plate) به عنوان روش های کمی نمونه گیری استفاده شده است. درمطالعه حاضر از روش تراشیدن که روشی دقیق جهت نمونه گیری از ضایعات پوستی می‌باشد، استفاده گردید.

گونه های مالاسزیا (به استثنای مالاسزیا پاکی درماتیس) جهت رشد در محیط کشت نیاز مطلق به چربی دارند و این نیاز را می توان با افزودن اسیدهای چرب با زنجیره بلند به محیط کشت برطرف نمود. مناسب ترین محیط برای شناسایی و تکثیر کلنی های مالاسزیا، محیط هایی نظیر محیط دیکسون تغییر یافته و محیط لیمینگ و نوتمن (LNA)که چربی ها در آن به صورت مخلوط و امولسیفیه در آمده است می باشد(۱،۲). با استفاده از این محیط ها، جداسازی گونه های حساس تر مانند مالاسزیا گلوبوزا ، مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا ابتوزا که در محیط های که روغن زیتون (اسید اولئیک) بصورت یک لایه روی محیط جامد اضافه شده رشد نمی کنند ، می توان اطمینان یافت(۲۰،۲۲).

در مطالعه حاضر نیز جهت جداسازی گونه های مختلف مالاسزیا ، از محیط LNA استفاده گردید. بر اساس مطالعات مختلف ، میزان جداسازی گونه های مالاسزیا از پوست، در محیط LNA بیشتر از محیط mDixon بوده و این محیط را می توان به مدت طولانی تری نگه داشت (۲۳،۲۰،۱).

در این مطالعه ۸۰/۵درصد نمونه بیماران درماتیت سبوروئیک کشت مثبت داشتند. در بررسی هایی که در ایران توسط ضیاء(۲۴) و ترازویی(۱۳) روی نمونه های پوستی بیماران درماتیت سبوروئیک انجام گرفت، نتایج کشت نمونه های درماتیت سبوروئیک به ترتیب در ۴۲ درصدو ۶۲/۱ درصدموارد مثبت بود که به مراتب از نتایج بررسی ما کمتر می باشد؛ احتمالاً علت اختلاف فوق در این دو بررسی به ترتیب ناشی از استفاده از محیطهای سابوروی حاوی روغن زیتون و mDixon می باشد.

در سال های اخیر تحقیقات متعددی در مورد بررسی توزیع گونه های مختلف مالاسزیا در ضایعات درماتیت سبوروئیک انجام گرفته است. در بررسی حاضر، گونه های غالب جدا شده از ضایعات این بیماران به ترتیب مالاسزیا فورفور۴۲/۴ درصد و مالاسزیا گلوبوزا ۳۹/۴ درصد بودند. نتایج این مطالعه با بررسی که بروی ۴۲ بیمار ژاپنی مبتلا به درماتیت سبورئیک انجام شده است که در آنها گونه های غالب به ترتیب مالاسزیا یا فورفور و مالاسزیا گلوبوزا بود، همخوانی دارد (۲۵).در بررسی دیگری برروی ۳۸ بیمار یونانی مبتلا به درماتیت سبورئیک با روش PCR-SSCP گونه غالب مالاسزیا گلوبوزا بوده است. شایان ذکر است که این بررسی نظیر این مطالعه، پلی مورفیسم منطقه ITS1 منتهی با روشی متفاوت مورد تجزیه تحلیل قرار گرفته است.(۲۶) در بررسی حاضر نتایج کشت نمونه های بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر در۸۱/۱ درصدموارد مثبت شد که این میزان از نتایج بدست آمده توسط شمس(۶۳ درصد) و دوتا (۵/ ۵۸ درصد) ترازوئی (۷۹/۸ درصد) بیشتر است(۲۸-۲۷ ، ۱۲). این در حالی است که در مطالعه گوپتا و همکاران در بسیاری از موارد علیرغم مثبت بودن آزمایش مستقیم، فقط ۴۳/۸ درصد نمونه ها کشت مثبت داشتند. (۲۹). لازم به ذکر است در سه بررسی اول از m Dixon

www.SID.ir

و در بررسی آخری نظیر این مطالعه از محیط LNA استفاده شده است و این محققین علت احتمالی پایین بودن نتایج کشت مثبت را نمونه گیری غلط ، ذکر نمودند.

در بررسی های مختلف مالاسزیا گلوبوزا بیش از سایر گونه ها از مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر جدا شده است (۳۱و ۳۰ و ۲۸ و۲۷ و ۲۵). در این بررسی نیز گونه غالب به دست آمده مالاسزیا گلوبوزا با فراوانی ۵۳/۳ درصد می باشد. که با نتایج بدست آمده توسط ناکابایاشی و دوتا هماهنگ است (۲۸ و ۲۵)، اما از نتایج بدست آمده توسط شمس(۷۳ درصد) کمتر می‌باشد (۲۷). این در حالی است که گونهٔ غالب جدا شده در مطالعهٔ گوپتا مالاسزیا سمپودیالیس(۵۹/۴ درصد) بوده، مالاسزیا گلوبوزا با اختلاف زیادی در رتبه دوم قرار داشت؛ هر چند که وی در بررسی نمونه های پیتیریازیس ورسیکالر نواحی گرمسیری خارج کانادا، مالاسزیاگلوبوزا را به عنوان گونه غالب گزارش نمود (۲۹). در مطالعه کرسپو نیز مالاسزیاگلوبوزا از ۹۷درصدضایعات پیتیریازیس ورسیکالر جدا شد که در ۶۰درصدموارد به تنهایی و در ۲۹درصدموارد به همراه مالاسزیا سمپودیالیس و در ۷درصدموارد همراه مالاسزیا اسلوفیه بوده است . در بررسی وی دو گونهٔ اخیر (مالاسزیا اسلوفیه و سمپودیالیس) به نسبت تقریباً مشابهی از نواحی فاقد ضایعه تنه جدا شدند، در حالیکه مالاسزیاگلوبوزا از این نواحی جدا نشد(۳۰). به علاوه مالاسزیاگلوبوزا ، همانند مالاسزیا اوبتوزا و رستریکتا از جمله گونه های حساس جنس مالاسزیا است که به سختی در محیط کشت رشد می کند و به سرعت توانایی رشد خود را در شرایط نامساعد از دست می‌دهد (۲۲-۲۰). جداسازی این مخمر با نسبت بالایی از ضایعات پیتیریازیس ورسیکالر نشان دهنده فراوانی آن در این ضایعات می باشد.

در پژوهش حاضر قطعه ITS1 با استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی F (18SF1)و R(5.8SR1)به وسیله روش PCR تقویت شد . ناحیه ITS1 کنار ژن 18S rDNA قرار دارد. ژن 18S دارای سکانس نسبتاً ثابت و محافظت شده در تمام یا اغلب قارچ ها است و لذا هدف خوبی برای انتخاب یک پرایمر رفت (forward) که بتواند به ژنوم اکثر قارچها بچسبد محسوب می شود و از سوی دیگر با توجه به ماهیت حفاظت شده ناحیه 5.8S ، محل خوبی برای انتخاب پرایمر برگشت (Reverse) است. این دو پرایمر باعث می شود قطعه ITSl به طور کامل و نیز 18S و 5.8S به طور جزئی در طی پروسه PCR تقویت شوند. بدین ترتیب با یک جفت پرایمر پس از PCR قطعاتی با طول متغیر و توالی متفاوت در بین گونه های مختلف به دست می‌آید. آن گاه می توان پلی مرفیسم موجود در قطعات را به کمک روش RFLP مورد آنالیز قرار داد.

بین دو ناحیه ITS1 و ITS2، ژن 5.8s rDNA را دربرمی گیرند، اندازهٔ این قطعات از حدود ۱۰۰۰ جفت باز در سلول انسان تا کمتر از ۳۰۰ جفت باز در بعضی مخمرها متفاوت است. معلوم شده است که این نواحی بینابینی نیز برای نسخه برداری اولیهٔ طی فراوری rRNA حائز اهمیت بسیار است(۳۲).

نواحی ITS در بسیاری پژوهش ها به عنوان قطعهٔ هدف برای منظورهای مختلف و به روش های متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. نکتهٔ مهم این است که قطعات 18S، 5.8S و 28S در ژن های rRNA هسته ای کدکننده (رمزدهنده) در بین قارچ ها نسبتاً محافظت شده (Conserved) بوده و برای درک ارتباطات فیلوژنتیک مفیدند(۳۳). بین این نواحی کدکننده ITS1 و ITS2 قرار دارند که با سرعت بیشتری تکامل یافته، لذا

www.SID.ir

Archive of SID

توالی آنها در بین حتی گونه های یک جنس متفاوت است. بدین ترتیب پلی مرفیسم حاصله می تواند کمک شایانی برای شناسایی جنس ها و حتی گونه های مختلف باشد که با روش های متنوعی قابل اجرا است.

از جمله این روش ها آنالیز توالی ITS تقویت شده با PCR ، استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس یا اختصاصی گونه و نیز پروب های اولیگونوکلئوتید، استفاده از RELP و غیره است. اغلب مطالعات نشان داده اند که تنوع توالی کافی در بین گونه های مختلف قارچ چه در ITS1 و چه در ITS2 در حدی است که بتوان از آنها جهت شناسایی گونه ها سود جست. همان طور که ذکر شد، ناحیهٔ ITS در بسیاری پژوهش ها، به کار گرفته شده است. با استفاده از تعیین توالی مستقیم (direct sequencing) ناحیه rDNA ITS ریبوزومی که با PCR تقویت شده است، مخمرها و کپک های بسیار شناسایی شده اند، که از جملهٔ آنها می توان به گونه های درماتوفیت ها، گونه های مالاسزیا، گونه های کاندیدا، گونه های کریپتوکوکوس و رودوتورولا ، گونه های آسپرژیلوس ، گونه های آلترناریا، کلادوسپوریوم، پنی سیلیوم و گونه های تریکوسپورون اشاره نمود(۳۴).

از ناحیه ITS برای شناسایی قارچ ها در سیستم RFLP نیز استفاده شده است. جهت شناسایی گونه های مالاسزیا، Gupta قطعهٔ ITS را در مبنای PCR-RFLP قرار داد. وی ژن 28S rDNA و ناحیهٔ ITS کنار آن را تقویت نموده و متعاقباً با آنزیم های *Eco*RI، *Nco*I و *Ava*I مورد هضم قرار داده با الگوهای الکتروفورتیک حاصله توانست ۵ گونه از ۷ گونه مالاسزیا را از یکدیگر متمایز سازد. اما موفق به افتراق مالاسزیا فورفور از مالاسزیا پاکی درماتیس و مالاسزیا گلوبوزا از مالاسزیا ریستریکا نگردید(۳۵).

میرهندی و همکاران جهت شناسایی گونه های مالاسزیا ژن 28SrDNA را تقویت نمودند سپس بر مبنای PCR-RFLP با استفاده از آنزیم های *Cfo*I و *Bs*+F5I توانستند ۱۱گونه استاندارد مالاسزیا را شناسائی کنند . نتایج به دست آمده از روش RFLP با نتایج به دست آمده از تعیین توالی DNA ۱۰۰درصدمطابقت داشت (۱۴).

در مطالعه حاضر نیزنتایج به دست آمده از آزمایش ITS PCR- RFLP با نتایج به دست آمده از تعیین توالی نمونه های DNA۱۰۰درصدمطابقت داشت. توالی های بررسی شده از 93درصدتا 99درصدبا توالی رفرانس خود در بانک ژنی (Gene Bank) شباهت داشتند. گونه غالب جدا شده در بیماران پیتیریازیس ورسیکالر مالاسزیا گلوبوزا وبعدازآن مالاسزیا فورفور بوددرحالیکه گونه غالب جدا شده در بیماران درماتیت سبوروئیک مالاسزیا فورفور وبعدازآن مالاسزیا گلوبوزا بود. همچنین الگوی حاصله از هضم آنزیمی قطعه ITS1 با آنزیم های *Cfo*I و *Bs*+F5I در مورد مالاسزیاهای بررسی شده در این مطالعه به حدی متفاوت و متمایز بود که گونه های مالاسزیا بدون ابهام شناسائی شدند. انجام ITS PCR- RFLP با استفاده از پرایمر های عام قارچی (general fungal primer) منجر به شناسایی و تمایز همزمان مالاسزیا و گونه های غیر مالاسزیا در نمونه های بالینی می شود. همراهی گونه های کاندیدا در ضایعات القا شده توسط مالاسزیا موجب پیچیدگی شکل بالینی، تاخیر در تستهای آزمایشگاهی و عدم پاسخ به درمان انتخابی می گردد(۲۶). دربررسی حاضر با روش مذکور در یک مورد همراهی کاندیدا و مالاسزیا مشاهده گردید.

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری کلیه بیماران و از زحمات معاونت محترم تحقیقات و فناوری، کلیه دست اندرکاران آن حوزه و همچنین از زحمات بی دریغ سرکار خانم صباح میاهی، کارشناس ارشد قارچ شناسی ، که امکان انجام طرح را فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را می نماییم. این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد قارچ شناسی خانم آزیتا بذرگر دانشجوی دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

References

1. Midgley G, Gueho E, Guillot J. Disease by Malassezia species,. In: Ajello L, Hay RJ. (editors). Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections, vol. 4. London. United Kingdom: Arnold: 1998. P 20-211.

2. Yarrow D, Ahearm DG. Malassezia Baillon. In: Kreger-van. The Yeasts. A Taxonomic Study. 3th ed. Amesterdam: Elsevier Sc Publ BV: 1984. P 882-885.

3.Shadzi S. Medical Mycology. 8th ed. Isfahan: Isfahan university Jahad publications; 2005. (Persian)

4. Zaini F, Mahbod ASA, Emami M. Comprehensive medical mycology .2nd ed. Tehran: Tehran University publications; 2005 (Persian).

5. Bergbrant IM. Seborrhoeic dermatitis and Pityrosporum ovale. Cultural, immunological and clinical studies. Acta. Derm. Venereol. Suppl. (Stockh). 1991;167: 1-36.

6. Eichstedt E. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. Frorip. Neue. Notizen. Aus. Dem Gebeite. Der. Naturkunde. Heilkinde. 1846; 39:270.

7. Faergemann J. Seborrhoeic dermatitis and Pityrosporum orbiculare: treatment of seborrhoeic dermatitis of the scalp with Miconazole-Hydrocortisone (Daktacort), Miconazole and hydrocortisone. Br J Dermatol 1986; 114: 695-700.

8.Sei Y, Hamaguchi T, Ninomiya J, Nakabayashi A, Takiuchi I. Seborrhoeic dermatitis: treatment with anti-mycotic agent. L Dermatol 1994; 21(5):334-340.

9. Faergmann J. Atopic dermatitis and fungi. Clin Microbial Rev 2002; 545-563.

10. Waersted A, Hjorth N. Pityrosporum orbiculare: a pathogenic factor in atopic dermatitis of the face scalp and neck? Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 1985; 114: 146-148.

11.Wessels MW, Doekes G, Van Ieperen-Van Kijk AG, Koers WJ, Young E. IgE antibodies to Pityrosporum ovale in atopic dermatitis. Br J Dermatol 1991; 125 (3): 227-232.

12.Gupta AK, Kohli Y,Li A, Faergemann J, Summerbell RC. In vito susceptibility of seven Malassezia species to ketoconazole,

www.SID.ir

Archive of SID

variconazole, itraconazole and terbinafine. Br J Dermatol 2000; 142 (4):758-765.

13. Tarazooie B. Isolation and identification of Malassezia species in skin lesions and healthy individuals .Tehran University of Medical Sciences, Health faculty, MSc Thesis 1994 (Persian).

14. 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 Microbiolo Methods 2005; 61: 281-284.

15. Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of Malassezia furfur from human skin. J Clin Microbiol 1987; 25: 2017–2019.

16.Yamada Y, Makimura K, Mirhendi H, Ueda K, Nishiyama Y, Yamaguchi H, Osumi M. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Jpn J Infect Dis 2002 55 (4): 122– 125.

17. Fatahi M, Shokohi T, Hashemi Sooteh MB, Hedayati MT, Okhovatian A, Tamaddoni A, et al. Molecular identification of Candida albicans isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6).J Mazand Univ Med Sci 2008; 17(61): 1-11 (Persian).

18. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Satio 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: 29-35.

19. Sambrook J, Fritsch JEF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989; 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

20. Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. Med Mycol 2000; 38(Suppl: 1) : 9-16.

21. Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus Malassezia with description of four new species. Antonie Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355.

22. Gulliot J, Gueho E, Lesourd M, Midgley G, Chevrier G, Dupont B. Identification of Malassezia species a practical approach. J Mycol Med 1996; 6:103-110.

23.Gueho E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belkurn A, Faergemann J. The role of Malassezia species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol 1998; 36(Suppl.1): 220-229.

24. Zia MA. The role of the Pityrosporum yeasts in psoriasis, seborrhoeic dermatitis and atopic dermatitis. Tehran University of Medical Sciences, Health faculty, MSc Thesis, 1994(Persian).

25.Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of Malassezia species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Med Mycol 2000; 38:337-341.

www.SID.ir

26. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. distribution of Malassezia species in pityriasis Versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major Pityriasis Versicolor isolate M. globosa. Br J Dermatol 2006; 154(5):854-859.

27. Shams M, Rassaee ML, Moosavi M, Razzaghi M. Identification of Malassezia species in patients with pityriasis versicolor submitted to the Razi Hospital in Tehran.Iranian Biomedical Journal 2001; 5(4): 121-126.

28. Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycologic study in India. Int. J Dermatol 2002 41 (11): 823-824.

29. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbell RC. Epidemiology of Malassezia yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. Med Mycol 2001;39(2): 199-206.

30. Crespo Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casano A. Isolation and identification of Malassezia spp. In pityriasis versicolor. Seborrheic dermatitis and healthy skin. Rev. Iberoam Micol 1999;16: S16-S21.

31. Crespo Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casano A, Crespo Erchiga A, Sanchez Fajardo F, Gueho E.Mycology of pityriasis versicolor. J Mycol Med 1999;9: 143-148.

32. 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.

33. James SA, Collins MD, Roberts IN. Use of an rRNA internal transcribed spacer to distinguish phylogentically closely related species of the genera Zygosaccharomyces and Torulaspora. Int J Syst Bacter 1996; 46:189-194.

34. Mirhendi H. Application of ITS1 and ITS2 rDNA sequences for identification of important Candida species. Tehran University of Medical Sciences, Health faculty. PhD Thesis 2001 (Persian).

35. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven Malassezia species. J Clin Microbiol 2000; 38:1869– 1875.

www.SID.ir