# تعیین گونه عوامل مالاسزیائی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر با استفاده از روش PCR-restriction enzyme

دکتر سیدحسین میرهندی[۱]، بیتا ترازویی[۲]، دکتر کامیار زمردیان[۲]، نیلوفر جلالی زند[۳]

۱ـ استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی، مرکز آموزش وتحقیقات بهداشتی اصفهان، ۲ـ دانشجوی Ph.D رشته قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳ـ کارشناس، آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی، مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان

زمینه و هدف : گونه‌های مالاسزیا بخشی از فلور طبیعی پوست انسان است. به علاوه این مخمرها در ایجاد بیماری‌های پوستی مختلفی هم چون درماتیت سبورئیک، درماتیت آتوپیک، شوره سر و پسوریازیس نیز نقش دارند. اخیراً محققان روش‌های مولکولی را برای تعیین گونه‌های مالاسزیا ارجح می‌دانند. در بررسی حاضر یک روش دقیق و ساده ژنوتیپی برای شناسایی و تعیین گونه عوامل مالاسزیایی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر در ایران به کار گرفته شده است.

روش اجرا: در این مطالعه توصیفی ۸۳ ایزوله بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR-restriction enzyme صورت گرفت.

یافته‌ها: M.glubosa شایع‌ترین گونه جداشده از ضایعه‌های پیتیریازیس ورسیکالر بود و پس از آن سایر گونه‌ها به ترتیب شامل M.furfur ، M.sympodialis ، M. restricta ، M. slooffiae بودند. هیچ موردی از M. packydermatis و M. obtusa مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نظر به این که در اغلب مطالعه‌های صورت گرفته، مالاسزیا سیمپودیالیس به عنوان گونه مالاسزیایی غالب در بین مالاسزیاهای فلور طبیعی پوست انسان بوده است، غلبه مالاسزیا گلوبوزا در ضایعه‌های بیماران پیتیریازیس ورسیکالر می‌تواند بر وجود خصلت‌های بیماری زا در این گونه دلالت داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: پیتیریازیس ورسیکالر، گونه‌های مالاسزیا، تشخیص مولکولی

*وصول مقاله: ۸۴/۸/۱۴ پذیرش: ۸۴/۱۰/۶ فصلنامه بیماری‌های پوست۱۳۸۵؛دوره ۹ (۲) : ۱۶۵-۱۷۲*

## مقدمه

جنس مالاسزیا(Malassezia) شامل گروهی از قارچ‌های مخمری است که فلور طبیعی پوست انسان و حیوان‌های‌خون‌گرم است‌و معمولاً برای رشد، به چربی نیاز دارند. این مخمرها عامل بیماری شایع پوستی پیتریازیس ورسیکالر (Pityriasis Versicolor) هستند(۳-۱). هم چنین شواهدی وجوددارد که نشان می‌دهد گونه‌های مالاسزیا در ایجاد بیماری‌های پوستی دیگر نظیر درماتیت سبورئیک، درماتیت آتوپیک، شوره سر و پسوریازیس نیز نقش دارند(۶-۴). در این بیماری، گاهی از ضایعه‌های

مؤلف مسوول: دکتر سیدحسین میرهندی ـ تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه قارچ شناسی و انگل‌شناسی پزشکی، صندوق پستی۶۴۴۶-۱۴۱۵۵

پست الکترونیک: mirhendi@sphtums.com

مبتلایان، عوامل ملاسزیایی جدا می‌شود و از سوی دیگر در بسیاری موارد بیماری‌های مزبور با تجویز داروهای ضد قارچی، رو به بهبود می‌روند. ضمن این که هم زمان با بهبودی، جمعیت مخمرهای مالاسزیا کاهش و جمعیت آن‌ها با عود بیماری، مجدداً افزایش می‌یابد(۲و۱).

اخیراً این مخمرها به عنوان عوامل پاتوژن فرصت‌طلب، در ایجاد بیماری‌های مهاجم کشنده‌ای هم چون سپتی سمی و پریتونیت به خصوص در نوزادان نارس و افراد بالغ دچار ضعف سیستم دفاعی، مطرح شده‌اند(۱۰-۷).

مطابق با طبقه‌بندی جدید که بر اساس توالی نوکلئوتیدهای DNA ریبوزومی صورت گرفته است، مالاسزیاها به هفت گونه شامل M. furfur ، M.restricta ، M.slooffiae ، M.obtusa ، M. packydermatis ، M.globosa، M.sympodialis تقسیم شده‌اند(۱۲و۱۱). در سال‌های اخیر گونه‌های جدیدتری نیز به این هفت‌گونه اضافه شده و درحال حاضر این جنس شامل ۱۲ گونه است(۱۶-۱۳).

برای تعیین گونه‌های مالاسزیا ویژگی‌های فیزیولوژیک، نظیر الگوی مصرف توئین‌های مختلف، واکنش کاتالاز، هیدرولیز صفرا و نیز بررسی مورفولوژی ماکروسکوپی به کار گرفته شده است(۱۷ و ۲و۱). اما با توجه به مرفولوژی نسبتاً مشابه و دشوار بودن جداسازی و نگه‌داری بعضی گونه‌ها مانند رستریکتا و گلوبوزا، و نیز تشابه و ابهام نتایج فیزیولوژیک در برخی گونه‌ها مانند فورفور، سمپودیالیس و اسلوفیه، روش‌های فنوتیپیک فوق‌الذکر، برای شناسایی گونه‌ها مناسب نیست، و لذا اخیراً محققان، روش‌های مولکولی را برای این منظور، ارجح می‌دانند (۱۹ و ۱۸ و ۲ و ۱). ما قبلاً یک روش دقیق و ساده ژنوتیپی را برای شناسایی ۱۱ گونه شناخته شده مالاسزیا معرفی کرده‌ایم(۲۰). در بررسی حاضر نیز برای تعیین گونه عوامل مالاسزیایی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتریازیس ورسیکالر در ایران روش مزبور به کار گرفته شده است. نتایج حاصل از این پژوهش در شناسایی و بررسی مولکولی انواع و تعیین فراوانی هر یک از گونه‌های مالاسزیا، می‌تواند در زمینه اپیدمیولوژی و پاتوژنز بیماری پیتریازیس ورسیکالر، که در ایران نیز بسیار شایع است، ره‌گشای تحقیق‌های آتی باشد.

## روش اجرا

در این مطالعه توصیفی ۸۳ ایزوله بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتریازیس ورسیکالر، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از سطح ضایعه‌ها به کمک چسب اسکاچ صورت گرفت. نمونه‌های حاصل در محیط دیکسون تغییر یافته (Modified Dixon medium) کشت داده و به مدت ۲ هفته در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. ایزوله‌های به دست آمده بعد از خالص سازی و کشت انبوه در محیط فوق‌الذکر، تا زمان آزمایش‌های تکمیلی در محلول گلیسرول ۳۰ درصد در فریزر $c°$ ۸۰- نگه‌داری شد.

DNA کروموزومی قارچ‌های جدا شده مطابق با روش قبلاً توصیف شده، استخراج شد(۲۰). به طور خلاصه یک لوپ پر از سلول مخمری (حدود ۱۰-۵ میلی‌متر مکعب) به تیوب‌های اپندرف منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris10Mm ، EDTA 1mM ، TritonX1002% ، Nacl ، 100mM)، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط مساوی فنل - کلروفرم و حدود ۲۵۰ میکرولیتر از دانه‌های شیشه‌ای (glass-bead) به قطر ۰/۵ میلی‌متر به آن افزوده و پس از حدود ۵ دقیقه تکان شدید در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. پس از استخراج مجدد با کلروفرم، به مایع رویی ۳۰۰ میکرولیتر ایزو- پروپانول اضافه و پس از ۱۰ دقیقه نگه‌داری در منفی ۲۰ درجه دردور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه شسته شد. رسوب نهایی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل یا بافر TE (Tris 10M ، EDTA 1mM) در ۲۰ درجه سانتی‌گراد

نگه‌داری شد.

۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده به مخلوط PCR شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت (TAACAAGGATTCCCCTAGTA) ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (ATTACGCCAGCATCCTAAG) ، ۰/۵ میکرولیتر DNTP و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase اضافه و حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر مدل Applied Biosystems طبق برنامه زیر طی ۳۰ سیکل صورت پذیرفت:

Primary Denaturation :۵ دقیقه، $94^{\circ}c$

Denaturation : ۴۵ ثانیه ، $94^{\circ}c$

Annealing: ۱ دقیقه، $55^{\circ}c$

Extension : ۴۵ ثانیه، $72^{\circ}c$

Final extension : ۷ دقیقه، $72^{\circ}c$

مطابق روش قبلاً توصیف شده (۲۰)، محصول‌های PCR توسط آنزیم CfoI بریده شد تا با استفاده از الگوهای مختلف متعلق به گونه‌های متفاوت مالاسزیا نوع آن‌ها تشخیص داده شود. به طور خلاصه ۲ میکرولیتر از محصول‌های PCR با ۲/۵ میکرولیتر بافر ویژه آنزیم و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر در تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری مخلوط و به مدت ۲ ساعت در حرارت $37^{\circ}c$ قرار داده شد.

محصول‌های PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ (۱/۵گرم آگارز در ۱۰۰cc بافر) و محصول‌های RFLP روی ژل ۱/۸٪ با استفاده از اختلاف پتانسیل ۱۰ ولت به ازا هر سانتی‌متر طول ژل، الکتروفورز شد. آن گاه ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه uvidoc با طول موج ۶۱۲ نانومتر مشاهده و به طریق دیجیتال عکس برداری شد.

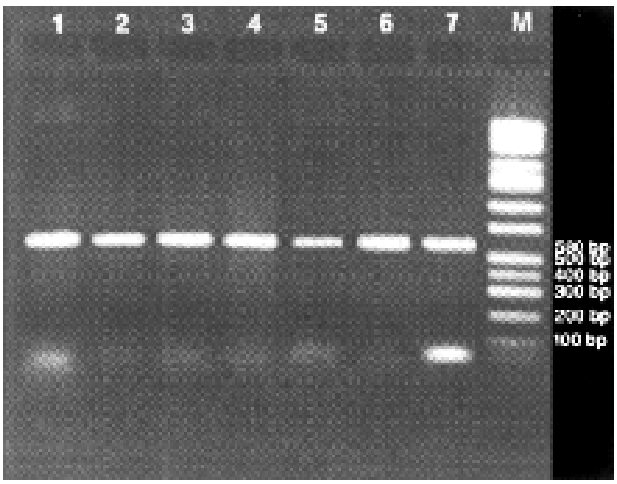
یافته‌ها

پس از بررسی نرم‌افزاری، توالی نوکلئوتیدهای قطعه 28SrDNA متعلق به گونه‌های مالاسزیا مشاهده شد، این قطعات در گونه‌های مالاسزیا از حیث نوع وتعداد نوکلئوتید اختلاف‌های اندکی داشتند. از روی این اختلاف‌ها آنزیم محدودالاثر CfoI به عنوان به‌ترین آنزیم برای افتراق این گونه‌ها از طریق PCR-RFLP انتخاب شد.

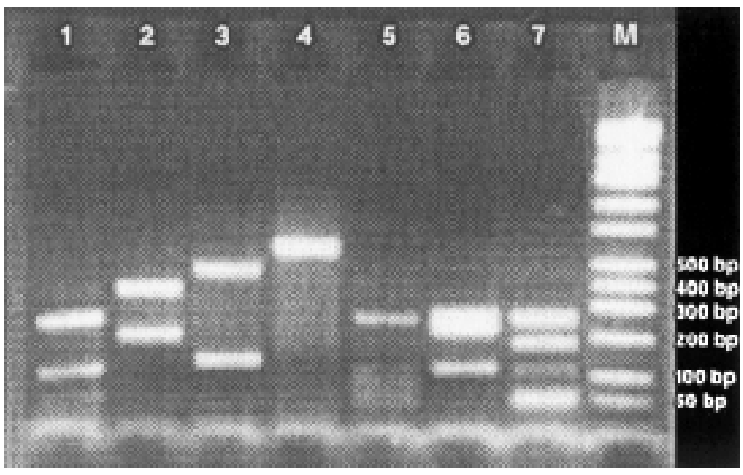
جدول شماره ۱ ـ اندازه محصول‌ها PCR مربوط به گونه‌های مختلف مالاسزیا قبل و بعد از برش با آنزیم CfoI

| گونه | اندازه محصول PCR | نواحی برش توسط CfoI | اندازه محصول RFLP |
|---|---|---|---|
| M.pachydermatis | ۵۸۰ | ۱۰۷,۳۵۷ | ۱۰۷,۲۵۰,۲۲۳ |
| M.sympodialis | ۵۷۸ | ۳۵۷,۳۷۸ | ۳۵۷,۲۱,۲۰۰ |
| M.globosa | ۵۸۴ | ۴۵۵ | ۴۵۵,۱۲۹ |
| M.obtusa | ۵۸۰ | ۱۰۷,۳۵۷,۳۷۸,۵۲۸,۵۳۰,۵۵۹ | ۱۰۷,۲۵۰,۱۸,۱۵۳,۲,۲۹,۲۱ |
| M.sloofiae | ۵۸۴ | ۱۰۷,۳۵۷,۴۴۴,۵۰۸ | ۱۰۷,۲۵۰,۸۷,۶۴,۷۶ |
| M.furfur | ۵۸۲ | ۱۰۷,۳۵۷,۴۷۰,۵۲۹,۵۳۱,۵۶۱ | ۱۰۷,۲۵۰,۱۱۳,۵۹,۲,۳۰,۲۱ |
| M.restricta | ۵۸۱ | - | ۵۸۱ |

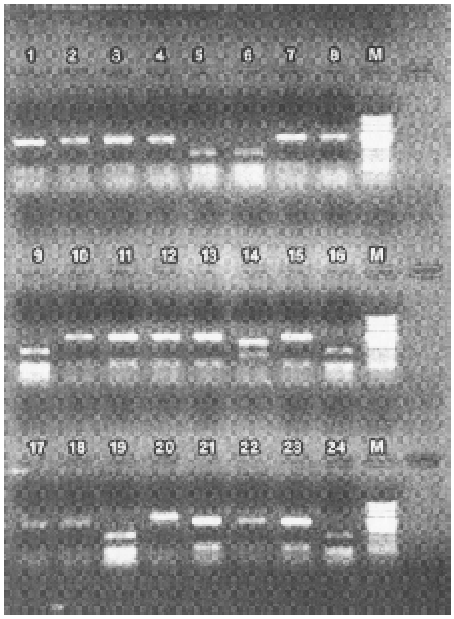
نتیجه الکتروفورزمحصول‌های حاصل از PCR هر کدام از گونه‌های استاندارد مالاسزیا (تصویرشماره ۱)، الکتروفورز محصول‌های حاصل از RFLP هر کدام از گونه‌ها (تصویرشماره ۲) و بالاخره الکتروفورز PCR-RFLP برخی از نمونه‌های مالاسزیا جداشده از بیماران (تصویرشماره ۳) مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر در زیر نشان داده شده است. محصول‌های PCR برای همه‌ی گونه‌ها تقریباً یکسان بوده اما پس از هضم اندونوکلئازی آن‌ها با آنزیم CfoI ، پروفیل متفاوتی به دست آمد.




تصویر شماره ۱ ـ الکتروفورز محصول PCR حاصل از تقویت قطعه 28SrDNA متعلق به ۷ گونه مالاسزیا
1-M.furfur, 2-M.sympodialis, 3-M.globosa, 4-M.restricta, 5-M.sloofiae, 6-M.pachydermatis, 7- M.obtusa, 8-Molecular marker 100bp ladder




تصویر شماره ۲ ـ الکتروفورز محصول‌های PCR-RFLP پس از برش با آنزیم CfoI مربوط به ۷ گونه مالاسزیا، نمونه‌های ۱ تا ۷ به ترتیب : M.obtuse ، M. pachydermatis ، M. slooffiae ، M.restricta ، M.globosa ، M.sympodialis، M.furfur ، نمونه M مارکر مولکولی (Ladder 100 bp)




تصویر شماره ۳ ـ نتایج الکتروفورز محصول‌های PCR-RFLP مربوط به برخی مالاسزیاهای جداشده از بیماران. نمونه‌های ۱-٤، ۷، ۸، ۱۰-۱۳ ، ۱۵، ۲۰-۲۳ نشانگر مالاسزیا گلوبوزا. نمونه‌های ٥،٦،٩،١٦،١٩،٢٤ حاکی از مالاسزیا فورفور و نمونه ١٤ مربوط به مالاسزیا سیمپودیالیس است. M : مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی است.

با توجه به الگوهای RFLP حاصل از گونه‌های استاندارد مالاسزیا که دقیقاً با جدول داده‌های کامپیوتری مربوط (جدول شماره ۱) تطبیق دارد، هویت ایزوله‌های بالینی تعیین شد.

گونه‌های جدا شده شامل M.globosa ۵۳ مورد (۶۳/۸٪)، M.furfur ۲۴ مورد (۲۸/۹٪) ، M.sympodialis ۳مورد (۳/۶٪) ، M.restricta ۲ مورد (۲/۴٪) وM.sloffiae یک مورد (۱/۲٪) بود. هیچ موردی از M.pachydermatis و M.obtusa مشاهده نشد.

## بحث

تا چند سال اخیر برای مالاسزیاهای عامل پیتریازیس ورسیکالر، تنها دو گونه در نظر گرفته می‌شد. یک گونه وابسته به چربی به نام M.furfur. یک گونه چربی دوست (اما نه وابسته به چربی)موسوم به M.pachydermatis ، جنس مزبور درحال حاضر باتغییر ملاک‌های طبقه‌بندی مرفولوژیک و فیزیولوژیک به معیارهای ژنتیکی و مولکولی شامل ۷ گونه است و ۵ گونه‌ی پیشنهادشده دیگر برای مالاسزیا مطرح است (۱۸و۱۶-۱۳ و۲و۱). معیارطبقه‌بندی جدید بر اساس نوع و تعداد نوکلئوئیدهای موجوددر قطعه سنگین DNA مسوول کدکردن RNA ریبوزومی یا 28SrDNA است. خاصیت قطعه مزبور این است که در بین اعضای وابسته به جنس، محافظت

شده(Conserved) بوده و لذا برای انتخاب پرایمرهای عمومی جنس در آن محل‌های مناسبی وجوددارد. در این مطالعه با در نظر گرفتن نقاط مزبور که بین تمام گونه‌های بررسی شده مالاسزیا مشترک هستند، پرایمرهای مناسبی انتخاب و استفاده شد که با موفقیت توأم بود و واکنش PCR ، به تقویت قطعه مزبور در تمام گونه‌های مالاسزیا منجر شد. از طرف دیگر این ناحیه ژنومی دارای نقاط کوچکی محتوی نوکلئوتیدهای متغیر (variable) در بین مالاسزیاهای مختلف بود و لذا برای انتخاب آنزیم یا آنزیم‌های restriction به منظور برش آن نواحی و ایجاد الگوی RFLP مناسب برای افتراق مالاسزیاها نقاط مناسبی است. در این تحقیق با توجه به بررسی‌های قبلی (۲۰) آنزیم CfoI برای شناسایی ایزوله‌های مالاسزیایی جدا شده انتخاب شد.

این آنزیم هفت گونه پذیرفته شده مالاسزیا را از یکدیگر افتراق داد و تنها تمایز M.furfur و M.sloffiea تا حدودی مشکل است. با افزایش غلظت آگارز در هنگام الکتروفورز، مشکل مزبور قابل حل است. به نظر می‌رسد که این سیستم PCR-RFLP راهی ساده و کم‌هزینه، سریع و درعین حال معتبر و دقیق برای شناسایی مخمرهای مالاسزیا است.

از بین ۸۳ مالاسزیای جدا شده از بیماران که با این روش شناسایی شدند، بیش‌ترین فراوانی متعلق به M.globosa (۶۳/۸۵٪) بود. نتایج مطالعه ترازویی و همکاران وی (۲۱) در رابطه با شناسایی گونه‌های مالاسزیای عامل پیتیریازیس ورسیکالر در ایران که با استفاده از روش‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک صورت گرفت تا حدود زیادی با نتایج حاصل از روش مولکولی حاضر تطابق دارد.

نظر به این که در اغلب مطالعه‌های صورت گرفته، در بین مالاسزیاهای فلور طبیعی پوست انسان گونه M.sympodialis به عنوان گونه مالاسزیایی غالب بوده است(۲۴-۲۲)، غلبه مالاسزیا گلوبوزا در ضایعه‌های بیماران پیتیریازیس ورسیکالر می‌تواند بر وجود خصلت‌های بیماری‌زایی در این گونه، دلالت داشته باشد. به این طریق نتایج بررسی حاضر قادر است دردرک پاتوژنیسیته بیماری پیتیریازیس ورسیکالرکه بیماری شایعی ـ به خصوص در جوانان ـ است کمک‌کننده باشد. تا آنجا که ما اطلاع داریم این بررسی از جمله محدودیت‌های مطالعه‌های صورت پذیرفته دررابطه با شناسایی عوامل پیتیریازیس ورسیکالر با استفاده از روش‌های مولکولی در جهان و اولین تحقیق از این دست در ایران است. بررسی عوامل مالاسزیایی موجود در ضایعه‌های پسوریازیس با همین روش هدف مطالعه‌های بعدی است که امید می‌رود نتایج آن به زودی منتشر شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش طی طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به اجرا درآمد که بدین وسیله از تمامی مسوولان و کارکنان آن معاونت و نیز همه‌ی اعضا شوراهای پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه، دانشکده بهداشت و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی کمال تشکر را داریم. از کمک‌های آقایان و خانم‌ها دکتر پریوش کردبچه، دکتر سیدجمال هاشمی، خوشقدم امیدی، لیلا حسین پور و محسن نوروزی نیز صمیمانه متشکریم.

## References

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

2-Midgley G, Gueho E, Guillot J. Diseases caused by Malassezia species, In: Ajello L, Hay RJ, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold; 1998: 201-11.

3-Benham RW. The cultural characteristics of Pityrosporum ovale-a lipophilic fungus. J Invest Dermatol 1939; 2: 187-203.

4-Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with Malassezia 2-species. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 21-57.

5-Bergbrant IM, Faergemann J. Seborrhoeic dermatitis and Pityrosporum ovale: a cultural and immunological study. Acta Dermatol Venereol 1989; 69: 332-35.

6-Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. Malassezia species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis 2002; 15: 133-42.

7-Bell LM, Alpert G, Slight PH, et al. Malassezia furfur skin colonization in infancy. Infect Control Hosp Epidemiol 1988; 9: 151-53.

8-Powell DA, Hayes J, Durrell DE, et al. Malassezia furfur skin colonisation of infants hospitalised in intensive care units. J Pediatr 1987; 111: 217-20.

9-Schleman KA, Tullis G, Blum R. Intracardiac mass complicating Malassezia furfur fungemia. Chest 2000; 118: 1828-29.

10-Gueho E, Boekhout T, Ashbee HR, et al. The role of Malassezia species in the ecology of human skin and as pathogens. Med Mycol 1998; 36: 220-29.

11-Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus Malassezia with description of four new species. Antonie Leeuwnhoek 1996; 69: 337-55.

12-Guillot J, Gueho E. The diversity of Malassezia yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. Antonie Leeuwenhoek 1995; 67: 297-314.

13-Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. New yeast, Malassezia yamatoensis, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 2004; 48: 579-83.

14-Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis. J Clin Microbiol 2002; 40: 1363-67.

15-Sugita T, Takashima M, Kodama RM, et al. Description of a new yeast species, Malassezia japonica, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. J Clin Microbiol 2003; 41: 4695-99.

16-Hirai A, Kano R, Makimura K, et al. Malassezia nana sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54: 623-27.

17-Guillot J, Gueho E, Lesourd M, et al. Identification of Malassezia species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-10.

18-Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven Malassezia species. J Clin Microbiol 2000; 38: 1869-75.

19-Makimura K, Tamura Y, Kudo M, et al. 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.

20-Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiod Methods 2005; 61: 281-84.

21-Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, et al. Study of the distribution of Malassezia species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol 2004; 4: 5.

22-Crespo Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casario A, et al. Mycology of pityriasis vesicolor. J Mycol Med 1999; 9: 143-48.

23-Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, et al. Quantitative culture of Malassezia species from different body sites of individuals with or without dermatoses. Med Mycol 2001; 39: 243-51.

24-Arzumanian VG. The yeast Malassezia on the skin of healthy individuals and patients with atopic dermatitis. Vestn Ross Akad Med Nauk 2001; 2: 29-31. Russian.