مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۹، شماره ۲: از ٦٥ تا ۷۳
تابستان ۱۳۸۵
Archive of SID

نحوهٔ انتقال و حیات گونه‌های مالاسزیا در محیط و عفونتهای سیستمیک

سیدامیر یزدان‌پرست*

استادیار و متخصص قارچ‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

هدف: گونه‌های مالاسزیا گاهی اوقات به‌عنوان عواملی کشنده همچون عفونت خون در نوزادان نارس (عفونت سیستمیک) تحت درمان با امولسیون چربی گزارش شده‌اند. هدف این مطالعه پاسخ به این تجمع سریع قارچی در سطح پوست نوزادان است.

مواد و روشها: به این منظور سوسپانسیونی از مالاسزیا سیمپودیالیس(۱)، مالاسزیا گلوبوزا(۲) و مالاسزیا رستریکتا(۳) در مقیاس (میلی‌لیتر/^{٤} ۱۰ میکروارگانیسم) تهیه شد.

(PBS with ۰/۰۵٪ [v/v] TritonX–۱۰۰, PH ۷/۹) این سوسپانسیونها در سطح مناطقی از قبل اندازه‌گیری شده از جنس چوب و فلز، کتان یا سطح پلاستیکی ریخته و اجازه داده شد تا خشک شوند. سپس با روش مالشی ویلیامسون و کلیگمن[1] یا با روش قرار دادن کتان یا پلاستیک در محلـول شستشو و به‌هم زدن محلول درون حلقه به‌مدت ۱ دقیقه، نمونه‌ها در فواصل منظم و تعیین شده جمع‌آوری شدند. سپس رقت‌های مختلف تهیه شد و روی پلیت آگار حاوی شیرکشت داده شد. لیمینگ– نوتمن[2] برای تعیین مقدار مالاسزیای منتقل شده بین افراد، مقدار معینی سوسپانسیون گونه‌های مالاسزیا روی کف دست افراد داوطلب ریخته و اجازه داده شد تا خشک شود. سپس داوطلب اول با داوطلب دوم دست می‌دهد و مقادیر انتقال مالاسزیا به دست داوطلب دوم با روش ویلیامسون و کلیگمن اندازه‌گیری شد. حیات مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا سیمپودیالیس روی سطوح چوبی، کتانی و پلاستیکی شبیه به‌هم بود و تا ۷۲ ساعت پس از تلقیح روی این سطوح، قابل برداشت بودند؛ در حالی‌که روی سطوح فلزی فقط تا ٤٨ ساعت حیات داشته و قابل برداشت بودند.

برای مالاسزیا رستریکتا الگو کاملاً تفاوت داشت و عوامل قارچی حداکثر تا ٤ ساعت بعد از تلقیح روی٤ سطح مختلف قابل برداشت بود. همچنین انتقال میکروارگانیسم از دستی به دستی دیگر، در اکثر آزمایشات با موفقیت همراه بود و مقیاس آن از ١٤ تا ۰/۲ درصد مقدار تلقیحی بود.

نتیجه‌گیری: در نتیجه چنین برداشت می‌شود که سطوح مواد مطالعه شده تقریباً شبیه موادی است که در محیطهای بیمارستانی وجود دارد و این مواد می‌توانند با میکروارگانیسم، آلوده شده و عامل بیماری را برای مدتی روی خود حمل و حفظ نموده و سپس به پوست نوزادان منتقل و باعث عفونت در آنان گردند. این نتایج برای پی بردن به نحوهٔ تجمع عوامل قارچی در سطح پوست و نیز بررسی اپیدمیولوژی عفونتهای قارچی نوزادان بسیار حایز اهمیت است.

کلید واژگان: مالاسزیا فورفور، مالاسزیا سیمپودیالیس، مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا رستریکتا، مالاسزیا پکی درماتیس

۱- مقدمـه

مالاسزیا فورفور، قارچی مخمری و لیپوفیل است کـه بـه‌صـورت ساپروفیت فلور نرمال پوست بوده و آن را از پوست سینه، پـشت و بازوهای بیش از ۹۰ درصد افراد سالم جدا کرده‌انـد و عفـونتی مزمن، خفیف و معمولاً بـدون علامـت در قـسمت لایـهٔ شـاخی پوست اسـتراتوم کورنیـوم[3] بـه‌صـورت ماکولهـای پوسـته دار، صـاف یـا کمـی برجـسته ایجـاد مـی‌نمایـد کـه بـه آن

* نشانی مکاتبه: تهران، بزرگراه همت، جنب بیمارستان میلاد، تلفن: ۸۸۰۵٤۳۵۷، دورنگار: ۸۸۰۵٤۳۵۵ E-mail: sayazdan@iums.ac.ir

1. Williamson & Kligman
2. Leeming & Notman
3. Stratum corneum

www.SID.ir

Archive of SID

پیتیریازیس ورسیکالر[1] گویند [۱] مالاسزیا پکی درماتیس[2] [۲] بیشتر از حیوانات جداشده‌است تا از انسان، همچنین مالاسزیا فورفور [۳] می‌تواند به‌صورت میسلیال[3] یا به‌نحو مخمری رشد نماید.

از ابتدای کشف مالاسزیا فورفور در سال ۱۸٤٦ به‌وسیلهٔ اشتد[4] ابهامات زیادی در مورد نامگذاری و طبقه‌بندی آن وجود داشته است. به‌خاطر مشکلاتی که در رابطه با کشت و جدا کردن قارچ عامل این بیماری وجود داشت، نامگذاری آن براساس مطالعه مورفولوژی در تراشه‌های پوست انجام شده است. اما سرانجام با افزودن فاکتورهای رشد، نظیر چربی آزاد به محیطهای کشت، این قارچ را کشت دادند و متوجه شدند که علاوه بر افراد بیمار، آن را می‌توان از پوست بعضی افراد سالم نیز جدا نمود. در محیط کشت، این قارچ سلولهای مخمری را ایجاد می‌کند که شبیه[5] (عامل شوره سر) بیضی یا بطری شکل است؛ ولی چون اغلب سلولهای آن گرد می‌باشند، قارچ عامل بیماری را[6] نامیدند.

امروزه نام ژنریک Malassezia جایگزین pityrosporum شده و طبق قوانین مربوطه این قارچ Malassezia. furfur نامیده می‌شود. امروزه با روشهای مولکولی پیشرفته نظیر Karyotyping و یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) [٤ و ۱۵] توانسته‌اند گونه‌های جدید این قارچ را شناسایی کنند.

جنس مالاسزیا در حال حاضر، ۷ گونه مهم و قابل تشخیص دارند که عبارتند از مالاسزیا فورفور[7]، مالاسزیا گلوبوزا[8]، (سرتایپB)، مالاسزیا پکی درماتیس[9]، مالاسزیا. اوبتوسا[10]، مالاسزیا سیمپودیالیس (سروتایپ A) [11]، مالاسزیا اسلوفیائی[12]، مالاسزیا. رستریکتا (سروتایپ C)[13] [۵].

مالاسزیا فورفور به‌صورت ساپروفت فلور نرمال پوست است و آن را از قسمتهایی از بدن که غدد سباسه ترشح بیشتری دارند، مثل سینه، صورت پوست سر، تنه و بازوها، جدا کرده‌اند؛ ولی به‌مقدار کمتر از نواحی مثل دستها و پاها جدا شده است. فرم کروی مالاسزیا بیشتر از روی پوست تنه و فرم بیضی و کشیدهٔ آن بیشتر از روی پوست سر و صورت جدا شده است هرچند که به اعتقاد بسیاری از قارچ شناسان، مالاسزیا با ایجاد میسلیوم به‌حالت کاملاً بیماریزا تبدیل می‌شود [٦].

شیوع عفونت در آب و هوای گرم بیشتر از شیوع آن در نواحی معتدل است. بیماری به نژاد و شغل بستگی چندانی ندارد و بیشتر در مردان جوان دیده می‌شود [۱] که شاید به‌علت بالا بودن میزان دهیدروتستوسترون در پوست آنان باشد که به افزایش ترشح سبوم منجر می‌شود. سروتایپ B و C بیشتر در قسمت صورت و پوست سر یافت می‌شود؛ در حالی که سروتایپ A بیشتر از سینه و قسمت پشت گزارش شده است [۷].

در مطالعه‌ای که سیلوا[14] و همکارانش انجام دادند، بیشترین تجمع عامل قارچی در بین نوزادان تا ۱۸ ماه (۲۳/۳ درصد) و ۱۱ تا ۱۵ سال (۲٦/۷ درصد) بود [۸] و در مطالعه مارکون پاول[15] بهترین سن برای تجمع عامل قارچی ۱۵ سالگی گزارش شده است [۹]. کانینگهام[16] و همکارانش، سویه مالاسزیا فورفور را براساس خصوصیات کلنیها در محیط جامد و نیز نحوه رشد میکروارگانیسم در محیط‌های مایع حاوی صفرای گوساله، گلیسرول، گلیسرول مونو استئارات، توئین ٦۰ و چربی کامل شیر گاو در یکی از سه گروه زیر طبقه‌بندی نمود: گروه A شامل سلولهای مخمری گرد هستند که کلونی آنها بزرگ (قطر حدود ۵ میلی متر)، کرم رنگ، صاف برجسته و دندانه‌دار می‌باشند در حالی‌که مخمرهای گروه B نیز گرد بوده‌اند ولی کلونی آنها کوچکتر است (حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر قطر) مسطح با مرکزی دکمه مانند، ظریف با حاشیه‌ای مضرس دیده می‌شوند و خلاصه مخمرهای گروه C کشیده و بیضی شکل بوده کلونی آنها کوچک و گنبدی شکل می‌باشد [۱۰] گونه‌های مالاسزیا به غیر از لایه استراتوم کورنیوم و فولیکول‌های مو می‌توانند ایجاد عفونتهای دیگر از جمله پریتونیت – ماستیت، سینوزیت و نیز ایجاد عفونتهای سیستمیک و کشنده بنمایند. در تحقیقات انجام شده مالاسزیا فورفور و مالاسزیا پکی درماتیس به‌عنوان عامل عفونت خون در نوزادان نارس تحت درمان با امولسیون چربی از طریق کاتتر[17] شناخته شده‌اند [۱۱] که بعد از مدت کوتاهی که از شروع درمان گذشت نوزاد گرفتار التهاب و عفونت عروق ریوی[18] می‌شود و بدنبال آن ذات الریه[19] تب و ترومبو سیتوپنی از یافته‌های بارز این عفونتهای سیستمیک است و مالاسزیا پاکی درماتیس از مایع بافتی گوش، چشم، واژن، پوست و خون بیماران جدا شده است. و اگر چه در انسان و حیوان به‌صورت فلور طبیعی نیز یافت می‌شود؛ ولی در نوزادانی که با لیپید تزریقی

1. Pityriasis versicolor
2. Malassezia pachydermatis
3. Mycelial
4. Eichstedt
5. Pityrosporum ovale
6. Pityrosporum orbiculare
7. Malassezia furfur
8. Malassezia globosa
9. Malassezia Pachydermatis
10. Malassezia obtusa
11. Malassezia sympodialis
12. Malassezia slooffiae
13. restricta

14. Silva
15. Marcon powell
16. Cunningham
17. Catheter
18. Pulmonary vasculitis
19. Pneumonia

www.SID.ir

Archive of SID

تغذیه می‌شوند از طریق کاتتر وریدی باعث ایجاد سندرم تب‌زا[1] می‌شود. برای تشخیص بیماریهای ناشی از مالاسزیا، مشاهده مخمر و یا حتی رشته‌های میسلیوم در زیر میکروسکوپ کافی نبوده و نیاز به شمارش تعداد مخمرها در نمونه می‌باشد[2] برای مثال مشخص شده است که بیشترین تعداد مالاسزیا در سطح یک میلیمتر مربع اندامهای فوقانی بالغین طبیعی، در حدود $۱/۱ \times ۱۰^{۴}$ واحد ایجادکننده کلونی CFU[3] می‌باشد در این زمینه، مشاهده بیش از ۸۰ مخمر در هر شان با درشتنمایی بزرگ نمونه‌های تهیه شده از پوسته‌های تنه، باید ما را به‌فکر احتمال عفونت ناشی از این قارچ بیندازد. برای درمان بهتر است از درمانهای موضعی استفاده شود چون امن‌تر بنظر می‌رسند و عوارض جانبی کمتری دارند؛ اما چون با عود بیماری مواجه هستیم امروزه بیشتر پزشکان از داروهای ضد قارچی سیستمیک برای درمان استفاده می‌کنند. تجویز سیستمیک کتوکونازول در درمان پیتریازیس ورسیکالر، درماتیت سبوروئیک و فولیکولیتهای مالاسزیایی موفق بوده و احتمال عود بیماری را کاهش می‌دهد ولی درمان طولانی مدت با آن به‌جهت مسمومیت کبدی[4] پیشنهاد نمی‌شود و بهتر است از پمادهای موضعی استفاده شود.

می‌توان برای عوارض جانبی کمتر به‌جای کتوکونازول[5] از ایتراکونازول[6] در درمان سیستمیک تینه آورسیکالر استفاده نمود. راه معالجه دیگر استفاده موضعی از گریزوفولوین و تربینافین است. برای درمان عفونتهای خونی و سیستمیک مالاسزیا بهترین درمان، حذف و بیرون کشیدن کاتتر درون وریدی و استفاده از آمفوتر یسین B است [۱۲].

از آنجا که امروزه در سطح مراکز نگهداری کودکان و نوزادان و بخصوص در بیمارستانها عفونتهای سیستمیک از مالاسزیا در سطح جهانی گزارش شده و نیز استفاده فراوان از کاتتر داخل وریدی به‌مدت طولانی و درمان با امولسیونهای چربی و به‌دلیل بستری شدن طولانی مدت نوزاد و نیز دست به دست شدن کودک که به تجمع سریع قارچ در پوست نوزاد کمک می‌کند، هدف این طرح و تحقیق برآن بنا شده است تا اولاً میزان انتقال مالاسزیا از فردی به فرد دیگر و نیز میزان انتشار به محیط اطراف بررسی شود؛ ثانیاً مدت زمانی که میکروارگانیسم می‌تواند حیات داشته باشد و در محیط زنده بماند تعیین شود. این اطلاعات می‌تواند نقش بسزایی در فهم ما از اپیدمیولوژی عفونتهای سیستمیک در نوزادان داشته باشد و کمک مؤثری در اندیشیدن در خصوص درمان مؤثرتر این بیماریها باشد.

1. Febrile
2. Colony count
3. Colony forming units
4. Hepato toxiicity
5. Ketoconazole
6. Itrakonazole

۲- مواد و روشها

الف- وسایل و مواد مورد استفاده

انتقال و زیست مالاسزیا روی موادی چون چوب، فلز، حلقه، کف دست، کتان و مواد پلاستیکی با روشهایی چون سواب (SWABBING) و روش WILLIAMSON & KLIGMAN [۱٤] اندازه‌گیری شد. روی این مواد به مقادیر مشخص مالاسزیا فورفور سروتایپ A,B,C تلقیح شد و مراحل زیست وحیات میکرو ارگانیسم در مدت زمانهای ۲، ٤، ٦، ۸، ۲٤، ٤۸، ۷۲ ساعت و در نهایت یک هفته مورد امتحان واقع شد. سپس نمونه‌ها در ۳٤ درجه سانتیگراد انکوبه و نتایج انتقال و حیات میکرو ارگانیسم‌های جدا شده روی مواد مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

ب- استرینهای مالاسزیا فورفور

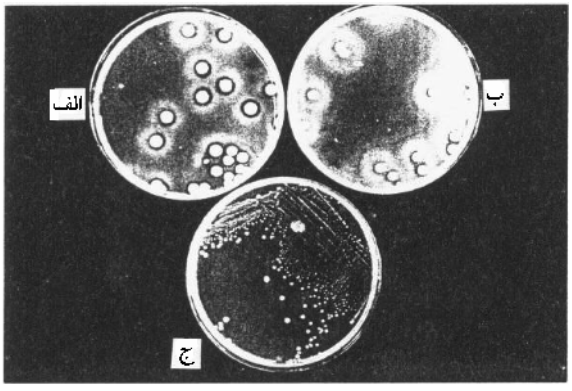
در این طرح پژوهشی از ۳ استرین مالاسزیا فورفور استفاده شد.

مالاسزیا فورفور سروتایپ A - ۱۳

مالاسزیا فورفور سروتایپ B - ۲۱/۳

مالاسزیا فورفور سروتایپ C - ٤۲/۲

به منظور حفاظت از مخمرها تمامی این استرین‌ها دوبار روی پلیت آگار مالاسزیا فورفور کشت داده شدند.



شکل ۱ کلنی مربوط به مالاسزیا فورفور سروتایپ الف، ب، ج

ج- تهیه آگار مالاسزیا فورفور برای کشت[7]

به‌منظور تهیه آگار مالاسزیا فورفور از روش لیمینگ و نوتمن[8] در سال ۱۹۸۷ [۱۳] استفاده شد.

7. Malassezia furfur Agar
8. Leeming and Notman

www.SID.ir

Archive of SID

د- تهیه محلول شستشو[1]

برای تهیه یک لیتر محلول شستشو، محلول A شامل (گرم ۱/۱۷ و $NaH_2PO_4 . 2H_2O$) + آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر به محلول B شامل (گرم ۱۰/۶ و Na_2HPO_4) + آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اضافه شد و غلظت PH برابر ۷/۹ می‌باشد (تقریباً ۸۵ میلی‌لیتر از محلول A به ۹۱۵ میلی‌لیتر محلول B اضافه می‌شود.

هـ - تهیه محلول رقیق کننده[2]

نصف محلول کامل شستشو به‌عنوان رقیق‌کننده استفاده شد به این صورت که محلول شستشو به‌روش بالا تهیه شده سپس به نسبت ۱:۱ با آب مقطر رقیق می‌کنیم. این محلول رقیق شده به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شد.

و- شمارش سلولی با هموسیتومتر[3]

برای تلقیح نمونه، مقادیری از کلونی از داخل پلیت برداشته و در ۱ میلی‌لیتر محلول شستشو خوب به‌هم می‌زنیم سپس با استفاده از هموسیتو متر، تعداد سلولهای مخمری در داخل محلول شمارش می‌شود.

ز- روشهای نمونه‌گیری[4]

۱- روش نمونه‌گیری ویلیامسون و کلیگمن برای مالاسزیا

یک حلقه فلزی استریل را روی یک سطح مشخص از چوب، فلز یا کف دست قرار داده و باید مطمئن بود که سطح مربوطه مسطح باشد و برای هریک به‌طور جداگانه باید از حلقه مربوط به خود استفاده شود. یک میلی‌لیتر از محلول شستشو را داخل حلقه ریخته و سپس به‌مدت ۱ دقیقه با میله مخصوص (Teflon rod) و استریل به‌طور مالشی به‌هم می‌زنیم. سپس با پیپت استریل محلول مربوطه را از داخل حلقه جمع‌آوری نموده و در لوله واسرمن[5] می‌ریزیم. دوباره یک میلی‌لیتر محلول شستشو در داخل حلقه ریخته و برای یک دقیقه عمل فوق را تکرار می‌کنیم و محلول را جمع‌آوری نموده و در لوله واسرمن اولی می‌ریزیم. این نمونه[6] خالص است. و سپس رقت‌های ۰، 10^{-1}و 10^{-2} از آن تهیه نموده و به‌مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت برروی آگار مالاسزیا کشت می‌دهیم.

1. Wash fluid
2. Diluent
3. Cell count by haemocytometer
4. Sampling methods
5. Wasserman
6. neat

۲- نمونه‌گیری به روش سواپ[7]

سطوح مورد نظر را با استفاده از یک سواپ پنبه‌ای استریل مرطوب، نمونه برداری نموده و سلولهای مخمری را در ۰/۹ میلی‌لیتر از محلول رقیق کننده تهیه شده قرار داده و یک دقیقه به‌هم می‌زنیم. شمارش سلولهای مخمری بدین صورت انجام می‌شود که ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف نمونه‌ها[8] را روی محیطهای کشت مالاسزیا قرار می‌دهیم.

۳- طرز نمونه‌گیری ازکتان و پلاستیک[9]

به‌منظور استریل نمودن کتان و پلاستیک، آنها را ابتدا در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو نموده سپس آنها را در داخل ظرف پتری قرار داده و در مرکز آنها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نمونه سلول مخمری قرار داده و اجازه می‌دهیم خشک شوند، زمان را یادداشت کرده و در درجه حرارت اتاق انکوبه می‌کنیم. بعد از گذشت زمان مشخص، قطعه کتان یا پلاستیک را درون محلول شستشو قرار داده خوب به‌هم می‌زنیم و از رقت‌های مختلف برروی آگار مالاسزیا کشت می‌دهیم. پس از گذشت ۲ هفته از انکوباسیون در ۳۴ درجه سانتیگراد، پلیت‌های کشت را ازنظر دانسیته در مخمرها بررسی می‌کنیم.

ح- طرح عملی برای مطالعه انتقال و زیست مالاسزیا

۱- *طرح اول*: زیست مالاسزیا بر روی نیمکتهای چوبی

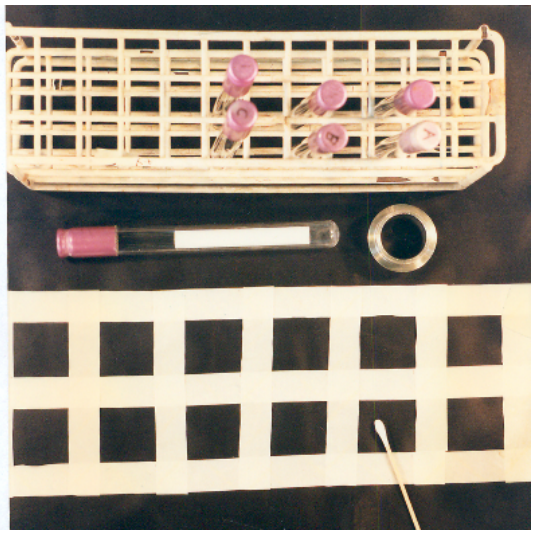
سوسپانسیونی از مالاسزیا (سروتایپ A, B, C) در محلول شستشو به‌مقدار 10^4 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر تهیه و روی سطح نیمکت چوبی با نوار چسب اتوکلاو ۱۶ مربع مساوی (۲/۵ cm × ۲/۵ cm) ترسیم شد و در داخل هر مربع مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری قرار داده شد. پس از خشک شدن و یادداشت زمان مربوطه، انجام آزمایش طرح اول را آغاز می‌کنیم. زمان مشخص شده عبارت بود از ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و یک هفته. پس از گذشت هریک از زمانهای فوق،

7. Swabbing method
8. Fold dilutions
9. Cotton and plastic

www.SID.ir

Archive of SID

مالاسزیا را از مربع مربوطه با روشهای نمونه‌برداری گفته شده، برداشت می‌کنیم و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر را روی محیط آگار مالاسزیا کشت می‌دهیم. (رقت‌های 10^{-2} و 10^{-1} و neat) شایان ذکر است هر آزمایش، برای هر سروتایپ دوبار تکرار شد.



شکل ۲ زیست مالاسزیا روی نیمکت چوبی با روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ

۲- *طرح دوم*: انتقال مالاسزیا از یک دست به دست دیگر[1]

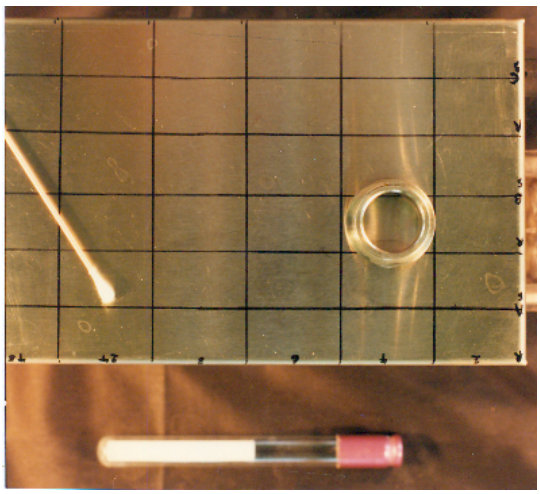
سوسپانسیونی از سلولهای مخمری مالاسزیا سروتایپ C, B, A در محلول شستشو (10^{4} میکروارگانیسم / میلی‌لیتر) تهیه شد. کف دست افراد داوطلب ابتدا با صابون آنتی سپتیک خوب شسته و سپس خشک شدند و نیز تعداد احتمالی سلولهای مخمری در کف دست این افراد در ابتدا شمارش شد تا اگر به‌طور ساپروفیت حامل این میکرو ارگانیسم هستند، مشخص شود. سپس در کف دست آنان مربعی به ابعاد $2/5\ cm \times 2/5\ cm$ مشخص نمودیم. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمری به‌وسیلهٔ نوک پیپت پلاستیکی استریل در کف دست داوطلب اول پخش شد، سپس اجازه داده شد تا خشک شود. باید توجه داشت که این دست تا زمان پایان انجام آزمایش هیچ جایی را نباید لمس می‌کرد. سپس داوطلب شمارهٔ ۱ با داوطلب شمارهٔ ۲ دست می‌دهد و زمان را یادداشت نموده و این مراحل برای داوطلب شمارهٔ ۳ هم تکرار می‌شود. سپس به‌وسیلهٔ روش ویلیامسون و کلیگمن مالاسزیا سروتایپ C, B, A نمونه‌گیری، کشت و شمارش می‌شود و برای صحت نتایج این آزمایش با ۳ داوطلب مختلف و ۳ مرتبه به‌طور مجزا روی هر سروتایپ انجام شد.

۳- *طرح سوم*: زیست مالاسزیا روی حلقه طلا[2]

در این طرح، وجود و حیات مالاسزیا روی حلقه طلا که بر دست افراد مختلف بود مطالعه شد. حلقه‌های طلا در ۵ میلی‌لیتر محلول شستشو برای مدت یک دقیقه، خوب چرخانده شدند و سپس رقت‌های مختلف تهیه و روی آگار مالاسزیا کشت داده شد.

٤- *طرح چهارم*: زیست مالاسزیا روی فولاد و فلزات[3]

روش اجرا شده، کاملاً شبیه طرح اول است.



شکل ۳ زیست مالاسزیا روی فلزات به‌وسیله روش ویلیامسون و کلیگمن

۵- *طرح پنجم و ششم*: زیست مالاسزیا روی کتان و پلاستیک[4]

سوسپانسیونی از مالاسزیا (10^{4} میکروارگانیسم / میلی‌لیتر) در محلول شستشو تهیه نموده و مربع‌هایی از پلاستیک و کتان به ابعاد ($2/5\ cm \times 2/5\ cm$) تهیه کرده (به‌طور استریل) و آنها را در داخل ظرف پتری قرار می‌دهیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از

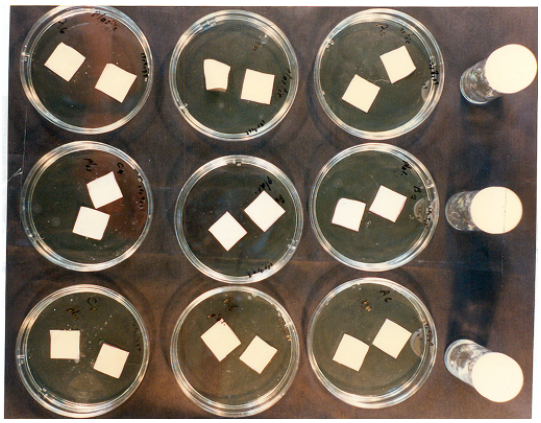
1. Malassezia – hand – to – hand transmition

2. Malassezia survival on gold ring
3. Malassezia survival on steel
4. Malassezia survival on cotton and plastic

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون مخمری را در وسط آنها قرار داده و اجازه می‌دهیم خشک شوند. زمان یادداشت شده و بعد از گذشت ۲، ٤، ٦، ۸، ۲٤، ٤۸، ۷۲ ساعت و یک هفته، مالاسزیا را از سطح آنها نمونه‌برداری می‌نماییم.



شکل ٤ زیست مالاسزیا روی کتان و پلاستیک

۳- نتایج

۱- نتایج شمارش مالاسزیا روی نیمکت چوبی

جدول ۱ بیانگر خلاصه‌ای از نتایج که به روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ انجام شده، است. برای شمارش مالاسزیا به‌روش ویلیامسون و کلیگمن باید از فرمول زیر استفاده شود.

$$\text{شمارش مخمرهای مالاسزیا} = \frac{\text{رقت} \times X \times ۱۰ \times ۲}{٤/۹۰۹}$$

$\pi r^2 = ٤/۹۰۹ cm^2$ و تعداد کلونیها = x

و برای محاسبه مالاسزیا به روش سواپ از فرمول ذیل استفاده می‌شود.

$$\text{شمارش مخمرهای مالاسزیا} = \frac{\text{رقت} \times X \times ۱۰}{\text{(محلول شستشو) } ۱۰}$$

این نتایج نشان می‌دهد که در دو ساعت اول شمارش مالاسزیا برای سروتایپ A و B وگاهی سروتایپ C همیشه مثبت است و نیز در ٤ ساعت اول برای سروتایپ A و B کاهش چندانی در شمارش مالاسزیا ملاحظه نمی‌شود. نتایج نشان داد که حیات مالاسزیا فورفور سروتایپ A و B روی نیمکت چوبی طولانی‌تر از سروتایپ C است.

جدول ۱ نتایج رشد مالاسزیا برروی سطح چوب

سروارهای مالاسزیا	Total cells inoculm	۲(h)	٤(h)	٦(h)	۸(h)	۲٤(h)	٤۸(h)	۷۲(h)	یک هفته	روشهای نمونه‌برداری
A	٤/۳۸	۳/۸۵	۳/۵۳	۲/۸۷	۲/٤٤	۲/۳۷	۱/۸۸	۱/۲۱	۰	R
		۳/۰٤	۳/۱	۲/۷۷	۲/۰۷	۱/۹۲	۱/۱۱	۰/۳	۰	S
B	٤/۳۰	۳/۷۱	۳/٤٤	۲/۸۵	۲/۳۲	۲/۱٤	۱/۵۱	۱/۲۱	۰	R
		۳/۱۸	۲/۹۷	۲/۲٤	۱/۹۱	۱/۷۲	۹/۰۹	۰/۷	۰	S
C	٤/۲۲	۱/٦۱	۱/۰۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	R
		۱/۲۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	S

(نمونه‌برداری با سواپ) R = Williamson & Kligman و S = Swabbing method

(غلظتها برحسب $\log \frac{cfu}{cm^2}$ بیان شده است)

۲- نتایج انتقال مالاسزیا از دستی به دست دیگر

شمارش این انتقال در اکثر آزمایشات، موفقیت‌آمیز بود و نتایج خوبی به‌دست آمد و در هر سه نوع سروتایپ مالاسزیا اتفاق افتاد. بیشترین میزان انتقال برای سروتایپ B (۱٤/۳۹ درصد) و کمترین انتقال برای سروتایپ C (۰/۲۳ درصد) بود و از فرمول ذیل برای شمارش میکروارگانیسم استفاده شد (جدول ۲).

$$\text{شمارش مخمرهای مالاسزیا} = \frac{\text{رقت} \times X \times ۲ \times ۱۰}{٤/۹۰۹}$$

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ درصد انتقال مالاسزیا در انتقال دست به دست

سروارهای مالاسزیا	درصد
A	۱/۳۶-۸/۸۸
B	۱/۶۶-۱۴/۳۹
C	۰/۲۳-۰/۶۹

۳- نتایج انتقال مالاسزیا از انگشتان به حلقه طلا

شمارش انتقال مالاسزیا از انگشتان به حلقه طلا مقیاسی بین ۳۰/۹۳ تا ۳/۳۳ درصد بود که برای نمونه‌گیری به‌روش سواپ از فرمول زیر استفاده شد (جدول ۳).

$$\text{شمارش مالاسزیا} = \frac{\text{رقت} \times X \times ۱۰x}{\text{(محلول شستشو)}۵}$$

و برای حلقه طلا این محاسبه انجام شد:

رقت × ۱۰ × x = شمارش مالاسزیا در حلقه طلا

جدول ۳ درصد انتقال مالاسزیا از انگشت به حلقه طلا

حلقه طلا	درصد
۱	۲۳ ،۳۳
۲	۳۰ ،۹۳
۳	۱۰ ،۶۶
٤	۳ ،۳۳
۵	۱۲ ،۶۳
٦	۱٤ ،۱٤

٤- نتایج شمارش مالاسزیا روی فلزات (شکلهای ۵، ٦، ۷)

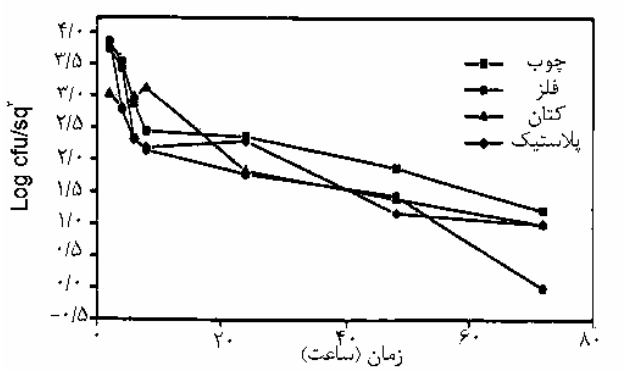
۵ و ٦- نتایج شمارش مالاسزیا روی کتان و پلاستیک (شکلهای ۵، ٦، ۷)

$$\text{شمارش مالاسزیا در کتان و پلاستیک} = \frac{\text{رقت} \times X \times ۱۰}{\text{(محلول شستشو)}۲}$$

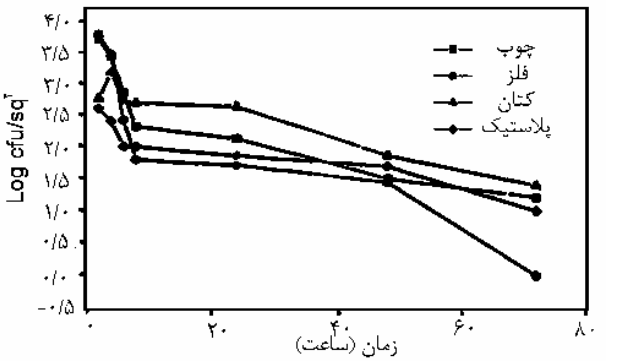
۷- مقایسه زیست مالاسزیا سروتایپ A، B و C روی چوب، فلز، کتان و پلاستیک با توجه به فاکتور زمان به‌وسیلهٔ روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ

در این مطالعه نتایج به‌دست آمده با روش ویلیامسون و کلیگمن بهتر ارزیابی شد.

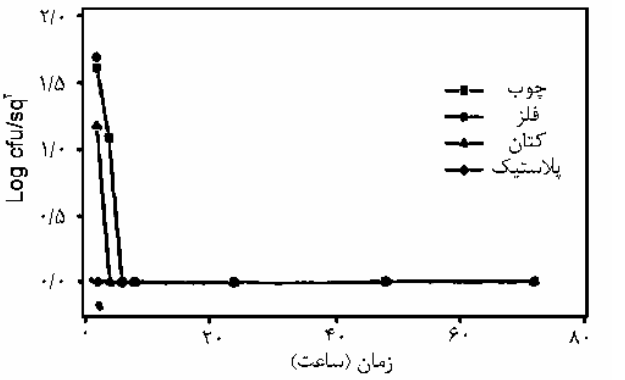
این نتایج در شکلهای ۵، ٦ و ۷ مشاهده می‌شوند. این نتایج نشان می‌دهد که حیات مالاسزیا سروتایپ A و B طولانی‌تر از سروتایپ C است.



شکل ۵ زیست مالاسزیا فورفور سروتایپ A با توجه به فاکتور زمان با روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ روی چوب، فلز، کتان و پلاستیک



شکل ٦ زیست مالاسزیا فورفور سروتایپ B با توجه به فاکتور زمان با روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ روی چوب، فلز، کتان و پلاستیک



شکل ۷ زیست مالاسزیا فورفور سروتایپ C با توجه به فاکتور زمان با روش ویلیامسون و کلیگمن و روش سواپ روی چوب، فلز، کتان و پلاستیک

www.SID.ir

Archive of SID

٤- بحث

سطح اکثر مواد و وسایلی که روزمره با آنها سروکار داریم به‌طور طبیعی ممکن است آغشته به سلولهای مخمری، کپکی یا قارچی باشد و این مسأله برای افرادی که دارای زمینه‌هایی چون کمبود سیستم ایمنی، فقر بهداشتی، سوء تغذیه، علل ژنتیکی، استفاده فراوان از آنتی‌بیوتیکهای وسیع الطیف و استفاده طولانی مدت از استروئیدها هستند، می‌تواند خطرناک باشد، بخصوص ضعف سیستم ایمنی نوزادان، بویژه نوزادان نارس و کم وزن در هنگام تولد، یا افزایش زمان به‌سر بردن در انکوباتور و نیز دست به دست شدن فراوان نوزاد به‌وسیلهٔ اقوام و والدین و نیز کادر پرستاران می‌تواند به تجمع سریع قارچ درپوست نوزاد کمک کند. در اغلب فانگمی‌ها، هر چند قارچ از قسمتهای مختلف کاتتر جدا شده، ولی بندرت از خون محیطی ایزوله شده است که علت این امر احتمالاً فیلتراسیون ارگانیسم به‌وسیلهٔ ریه یا سیستم رتیکولو اندوتلیال می‌باشد. ورود قارچ به داخل خون، شاید به‌علل زیر باشد، آلودگی در زمان جایگذاری کاتتر، مهاجرت قارچ از پوست اطراف کاتتر یا تزریق امولوسیون چربی آلوده و عبور جریان خون از منابع آلوده، مالاسزیا فورفور و مالاسزیا پکی درماتیس به‌عنوان عوامل عفونتهای سیستمیک گزارش شده‌اند.

مالاسزیا فورفور فلور طبیعی پوست بدن انسان بوده و مالاسزیا پاکی درماتیس فلور پوست حیوانات می‌باشد. اصولاً به‌دلیل فقدان محیط کشت مناسب، فیزیولوژی مالاسزیا هنوز کاملاً روشن نیست، تنها نکته‌ای که تاکنون مشخص شده نیاز مالاسزیا به مواد لیپیدی است. ناتوانی مالاسزیا در سنتز اسیدهای چرب اشباع با زنجیره‌هایی به طول ۱۲ تا ۲۰ کربن علت اصلی این نیاز می‌باشد. از آنجا که مالاسزیا ارگانیسم فرصت‌طلبی است، ارتباط بین آن و میزبانان سالم و بیمار، بسیار مهم است و پی بردن هرچه بیشتر به شرایطی که موجب شعله‌ور شدن عفونت می‌گردد، می‌تواند در مبارزه و پیشگیری از بیماری بسیار مفید باشد. هنوز کاملاً مشخص نشده است که سیستم ایمنی میزبانان سالم دقیقاً با کدام مکانیسم رشد مخمر را در سطح پوست کنترل می‌نمایند یا این‌که چه تغییراتی در قارچ مخمری یا میزبانان رخ می‌دهد که این ارگانیسم طبیعی سطح پوست، تبدیل به قارچی بیماریزا می‌شود. آنچه که تاکنون ثابت شده، تغییر شکل آنان است که از حالت مخمری بیضی شکل به‌حالت کروی درآمده و در بعضی موارد تولید رشته‌های میسلیال می‌نمایند که حالت بیماریزایی دارد. نحوهٔ انتقال و زیست گونه‌های مالاسزیا در محیط و روی سطوح مختلف و از سطحی به سطح دیگر تاکنون مطالعه نشده بود و در این طرح برای اولین بار به این پژوهش همت گمارده است که نتایج آن در چهارمین کنگره قارچ شناسان پزشکی اروپا در گلاسکوی اسکاتلند مطرح شد و مورد استقبال متخصصان امر قرار گرفت.

نتایج این تحقیق به‌خوبی نشان داد که مالاسزیا فورفور سروتایپ A و B قادرند به‌راحتی در روی سطوحی چون چوب، فلز، کتان و پلاستیک تا ۷۲ ساعت به زندگی خود ادامه دهند و سروتایپ C تا ۲ ساعت که در حقیقت این سطوح را می‌توان به آسانی در مراکز بیمارستانی و محل نگهداری نوزادان و کودکان همچون تخت بیمارستان، تشک، ملحفه، لباسها، وسایل آشپزخانه و سایر وسایل مشاهده نمود. شاید اینها بتوانند نقشی در انتقال داشته باشند، یا دست پرستاران و سایر پرسنل بیمارستانی در جابجایی نوزادان عاملی باشد در انتقال و پخش این سلول مخمری قارچی، بخصوص در مواردی که آلودگی محیط بیمارستانی به این عوامل زیاد باشد.

به‌طوری‌که در این پروژه انتقال مالاسزیا از یک دست به دست دیگر ١٤/٣٩ درصد گزارش شد. این در حالی است که اگر غلظت میکروارگانیسم را در محلول بیشتر کنیم، درصد انتقال هم بالا می‌رود.

این نتایج، نشان داد که برای انجام انتقال عامل قارچی، تماس نزدیک ضروری است و نیز انتقال از طریق وسایلی چون فلزات، چوب، کتان و یا مواد پلاستیکی امکان پذیر است؛ چون میکروارگانیسم می‌تواند تا ساعتها روی این سطوح به حیات خود ادامه دهد. اختلاف مقاومت و تفاوت بین سروتایپ‌های A , B و C مشاهده شده در این پروژه تحقیقی، از نکات قابل توجه و جالب طرح بود. این طرح می‌تواند کمک بزرگی برای بررسی مجدد بیولوژی مالاسزیا و مکانیسم انتقال این میکروارگانیسم باشد به امید آن‌که این تحقیق بتواند به مطالعه بیشتر در زمینه اپیدمیولوژی عفونتهای قارچی منتشره در بیمارستانها منجر شود و به عاری ساختن مراکز و محیطهای بیمارستانی از این نوع عوامل کمک کند.

٥- تقدیر و تشکر

برخود لازم می‌دانم از زحمات دکتر Ruth Ashbee از دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه لیدز انگلستان به‌خاطر اهدای استرینهای مالاسزیا فورفور و نیز حمایت و پشتیبانی ایشان از این طرح تحقیقی تشکر نمایم. همچنین برای مرحوم پرفسور ای. جی. وی. اونس (Prof. E. G. V. Evans) رئیس انجمن بین‌المللی قارچ‌شناسان (ISHAM) که در زمان انجام این پروژه از راهنماییهای مفید خود، اینجانب را بهره‌مند ساخته‌اند از درگاه احدیت، طلب آمرزش و مغفرت نمایم.

www.SID.ir

Archive of SID

٦- منابع

[1] Evans, E.G.V. (1985) Essentials of Medical Mycology, chapter 8, pages 68-72.

[2] Kwon-Chung, K.J. and Bennet, J.E. (1993), Medical Mycology, Lea and Febiger, chapter 8, pages 170-182.

[3] Schmidt A. (1997), Malassezia furfur: a fungus belonging to the physiological skin flora and is relevance in skin disorders. Cutis, 59 (1) ; 21-24.

[4] Guillot, J. Gheho, E (1995) The diversity of Malassezia yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons Antonie Van Leeuwenbock, 67:297-314.

[5] Guillot, J. Gheho, E. Lesourd, M. Midgley, G. Cherrier, G. Dupont, B. (1996). Identification of Malassezia species Journal of Mycology, Med: 6, pp. 103-110.

[6] Ingham, E. Cunningham, A.C. (1993) Malassezia furfur (Review) Journal of Medical and Veterinary Mycology Vol. 31, pp. 265-268.

[7] Ashbee, H.R., Ingham, E, Holland, K.T.Q Cunliffe, W.J. (1993), The carriage of Malassezia furfur, serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrhoeic dermatitis and controls. Brithish Journal of dermatology Vol. 129, pp. 533-540.

[8] Silva,V. Ditilia, C. Fishchman, O. (1995-1996) Skin colorization by Malassezia furfur in healthy children up to 15 years old, Mycopathologia Vol. 132 (3): 143-5.

[9] Marcon, M.J. & Powell, D.A. (1988) Malasszia furfur, Clinical Micribiology Newsletter Vol. 10, pp. 41-46.

[10] Cunningham, A.C. Leeming, J.P, Ingham, E. Gowland, G. (1990) Differentitation of three serovars of Malassezia furfur. Journal of Applied Bacteriology Vol. 68, pp. 439-446.

[11] Marcon, M.J Powell, D.A. (1992) Human infections due to Malassezia spp. (review) Clinical microbiology reviews Vol.5, pp 101-119.

[12] Surmont, I. Gavilanes, A. Vandepitte, J., Devilieger, H. Eggermont, E. (1989) Malassezia furfur fungaemia in infants receiving intra venous lipid emulsions, Avarity or just under estimated? European Journal of Pediatrics Vol, 148, pp 435-438.

[13] Leeming, J.P, Notman, F.H. (1987) Improved isolation and enumeration of Malassezia furfur from human skin. Journal Clinical Microbiology Vol, 25, pp. 2017-2019.

[14] Williamson & kligman, p. Kligman, A.M. (1965) A new method for the quantitative investigation of cutaneous bacteria. Journal Invertigatio of Dermatology Vol. 45, pp. 498-503.

[15] Determination of cutaneous colonization of jenus Malassezia in neonates that care in hospitals of Tehran University with using PCR-RFLP method. Bita Tarazooee *at el.* Department of Parasitology and Mycology, University of Tehran, 2004.

[16] 4 th Congress of the European Confederation & Medical Mycology, Glasgow, scotland 11 - 13th May, 1998.

www.SID.ir