

## شناسایی گونه‌های مالاسزیای جداشده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر با استفاده از روش PCR-RFLP

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

**روش اجرا:** از در این مطالعه توصیفی ۶۰ ایزوله‌ی بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتیریازیس و رسیکالر مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP صورت گرفت. در این روش ناحیه‌ی 2 Internal Transcribed Spacer (ITS2) تکثیر شد و توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی AluI، ITS2 و ITS3 توسط پرایمرهای ۴ و ۳ ITS قرأت گردید. در این روش سه اندونوکلئاز تحدیدی ZnBP1 و MspAI قطعات مشخصی برای هر گونه‌ی مالاسزیا به دست آمد.

**یافته‌ها:** گونه‌های جداشده از بیماران به ترتیب مالاسزیا فورفور (۳۶٪)، مالاسزیا گلوبروزا (۲۰٪)، مالاسزیا سیمپودیالیس (۲۰٪)، مالاسزیا اسلوفیئی (۳٪)، مالاسزیا رستریکتا (۳٪) و مالاسزیا آتبوسا (۱۶٪) بودند. در ضمن هیچ موردی از مالاسزیا جاپونیکا، مالاسزیا پکی درماتیس، مالاسزیا درماتیس، مالاسزیا نانا و مالاسزیا یاماتوئسیس مشاهده نشد. گونه‌ی مالاسزیا سیمپودیالیس در گروه زنان بیشتر از گروه مردان مشاهده شد ( $P=0.02$ ).

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

**کلیدواژه‌ها:** مالاسزیا، پیتیریازیس و رسیکالر، PCR-RFLP

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۳۱ پوست و زیبایی؛ تابستان ۱۳۹۰، دوره‌ی ۲: ۱۱۴-۱۰۶

دکتر مهناز محمودی راد<sup>۱</sup>  
اکرم میرامین محمدی<sup>۲</sup>  
دکتر پرویز طوسی<sup>۱</sup>  
دکتر علی خامسی پور<sup>۲</sup>  
دکتر امیرهونگ احسانی<sup>۳</sup>  
سیدابراهیم اسکندری<sup>۲</sup>  
نیکی محمودی راد<sup>۱</sup>  
یاسمون میردامادی<sup>۱</sup>  
زینب قاسمی<sup>۳</sup>  
محسن گرامی شعار<sup>۴</sup>  
شیما یونس پور<sup>۱</sup>

۱. مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
  ۲. مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
  ۳. گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
  ۴. گروه انگل شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
- نویسنده‌ی مسئول:

دکتر اکرم میرامین محمدی  
تهران، خیابان طالقانی غربی، شماره‌ی ۴۱۵،  
کد پستی: ۱۴۶۶۱۳۶۷۵ پست الکترونیک:  
miramin48@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

آن‌ها در پوست به حد اکثر می‌رسد دیده می‌شود. بنابراین در بچه‌ها که بودن میزان چربی موجب کاهش میزان وقوع آن می‌گردد. این بیماری دارای انتشار جهانی بوده و در نواحی گرمسیر شیوع بیشتری دارد.<sup>۱</sup> در ایران پیتیریازیس و رسیکالر در مناطق گرم و

### مقدمه

پیتیریازیس و رسیکالر بیماری قارچی مزمن طبقه‌ی شاخی پوست است که با ایجاد ضایعاتی به رنگ‌های مختلف در پوست مشخص می‌شود. بیماری اغلب در سن بلوغ و میانسالی که مقدار ترشحات چربی و غلظت

ملاسزیا افزوده شده است و ارتباط آن‌ها با بیماری‌های پوستی در دست بررسی می‌باشد<sup>۶</sup>.

روش‌هایی که برای طبقه‌بندی مولکولی گونه ملاسزیا به کار گرفته شده‌اند را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: روش‌هایی که اختلافات سکانس استرین‌ها را شناسایی می‌کنند و روش‌هایی که مارکرهای DNA پلی‌مرفیک را برای افتراق زیرتایپ‌های گونه‌های ملاسزیا تکثیر می‌کنند. در سال‌های گذشته روش‌های گوناگون تایپینگ مولکولی بر اساس PCR یک قطعه‌ی مشخص و به دنبال آن جست‌وجوی موتاسیون‌ها در آن قطعه انجام شده است<sup>۶-۱۳</sup>.

در آینده‌ی نزدیک، تایپینگ مولکولی بهترین وسیله برای مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد بود و توسط این روش‌ها می‌توان پاتوبیولوژی گونه‌های ملاسزیا را در ارتباط با بیماری‌های پوستی توضیح داد<sup>۶</sup>.

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

مرطوب جنوبی شیوع فراوان دارد. استرس، عفونت‌های مزمن، فقر بهداشتی، عرق کردن فراوان، سوء‌غذیه، زمینه‌ی ژنتیکی، استفاده‌ی طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌های با محدوده‌ی اثر وسیع، پوشش‌های تنگ نایلونی و استفاده از استروئیدها از جمله عوامل مستعد‌کننده‌ی ابتلاء به این بیماری هستند<sup>۲</sup>. تاکنون ۱۱ گونه از ملاسزیا از جمله ملاسزیا فورفور، ملاسزیا اسلوفیئی، ملاسزیا گلوبوزا، ملاسزیا سیمپودیالیس، ملاسزیا پاکی‌درماتیس، ملاسزیا رستریکتا و ملاسزیا آبتوسا با روش‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی شناخته شده که در نواحی مختلف جهان در صدهای متفاوتی از آن‌ها گزارش گردیده است<sup>۳</sup>.

ملاسزیا مخمری دو شکلی است که به صورت فلور طبیعی روی پوست بدن وجود دارد. این قارچ فرست‌طلب بوده و می‌تواند به صورت تهاجمی در میزبان مستعد، بیماری پیتیریازیس و رسیکالر ایجاد کند<sup>۶</sup>. این ارگانیسم اغلب در قسمت‌هایی از بدن که غدد سباسه فعال‌تر هستند دیده می‌شود. گونه‌های ملاسزیا تمایل دارند که از چربی‌ها به عنوان سوبسترا استفاده کنند و اغلب گونه‌ها نیاز مطلق خود را از آن‌ها به دست می‌آورند. در محیط‌های کشت آزمایشگاهی به ندرت جدا می‌شوند به جز در مواردی که نیازهای تغذیه‌ای خاص آن‌ها در محیط‌های اختصاصی فراهم شود<sup>۶</sup>.

در سال‌های گذشته هفت گونه از ملاسزیا شامل ملاسزیا فورفور، ملاسزیا اسلوفیئی، ملاسزیا گلوبوزا، ملاسزیا سیمپودیالیس، ملاسزیا پکی‌درماتیس، ملاسزیا رستریکتا و ملاسزیا آبتوسا با روش‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی شناخته شده که در نواحی مختلف جهان میزان شیوع متفاوتی از آن‌ها گزارش گردیده است<sup>۶-۱۳</sup>. اخیراً چهار گونه‌ی دیگر شامل ملاسزیا درماتیس، ملاسزیا جاپونیکا، ملاسزیا نانآ و ملاسزیا یاماتوئنسیس به گونه‌های جنس

استخراج شده، به هر میکروتیوب کیت DNA میزان دو میکرولیتر از DNA استخراج شده و چهار میکرولیتر از محلوت آماده شده از دو پرایمر یونیورسال

با سکانس‌های زیر افزوده می‌شد:

ITS3 (5'-GCATCGATCAAAGAACGCGAGC-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

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

محصول PCR بر روی یک ژل آگاروز ۴٪ بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیومبروماید قابل مشاهده بود. با انجام RFLP توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی *BanI*, *AluI* و *MspAI* قطعات مشخصی برای هر یک از گونه‌های مالاسزیا توسط ژل الکتروفورزیس محصول هضم شده توسط آنزیم‌ها به دست آمد که بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیومبروماید این قطعات قابل مشاهده بود.

### یافته‌ها

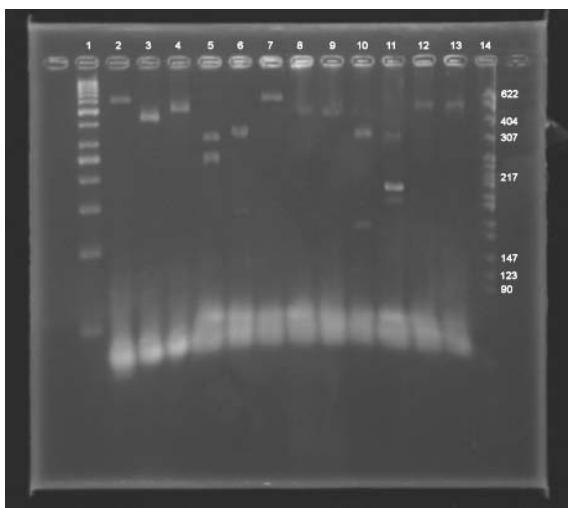
از ۶۵ بیمار تحت مطالعه، ۵ بیمار (۷٪) از نظر مالاسزیا منفی بودند و از مطالعه کنار گذاشته شدند. از ۶۰ بیمار مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر، ۴۰ بیمار (۶۶٪) مرد بودند. میانگین و انحراف معیار سن بیماران به ترتیب ۳۱,۲۲ و ۱۱,۷۱ سال (دامنه سنی ۱۲-۶۰ سال) بود.

rDNA 5.8S و بخشی از ناحیه‌ی 28S را در تکثیر می‌کرد همراه با سه آنزیم اندونوکلئاز تحدیدی PCR-RFLP و *MspI* و *HinfI* و *AluI* استفاده نمودند. این روش برای شناسایی ۷ گونه‌ی مالاسزیا که تا آن زمان شناخته شده بود در شناسایی گونه‌های مالاسزیا در نمونه‌های پوسته‌ی بیماران مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر و درماتیت سبورئیک به کار گرفته شد<sup>۱۴</sup>. در سال ۲۰۰۶ همین محققین بعد از شناسایی ۴ گونه‌ی دیگر مالاسزیا، با تغییر RFLP را برای هر ۱۱ گونه تعمیم دادند<sup>۱۵</sup>.

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

### روش اجرا

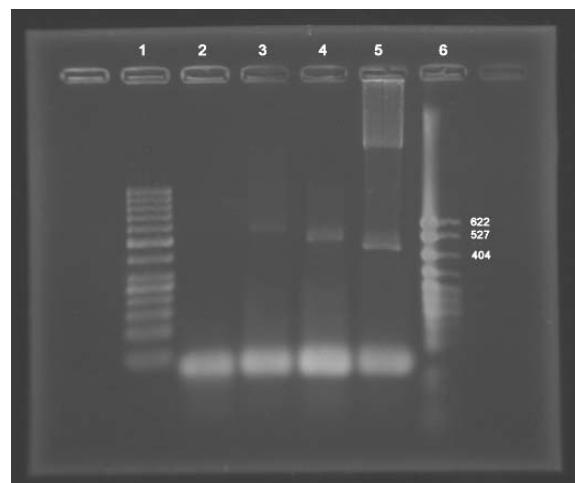
این مطالعه از دی‌ماه ۱۳۸۷ به مدت یک سال روی ۶۵ بیمار مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر مراجعه کننده به درمانگاه پوست بیمارستان شهردادی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، و بیمارستان رازی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. از این افراد توسط اسکالپل استریل نمونه‌ی پوسته تهیه، و در پاکت‌های سیاه جمع‌آوری شد. همچنین سه سویه‌ی مالاسزیا فورفور (CBS9577)، مالاسزیا سیمپوڈیالیس (CBS7222) و مالاسزیا گلوبوزا (CBS7874) به عنوان شاهد در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. از بیماران بعد از تأیید رضایت‌نامه، نمونه گرفته می‌شد و نیز پرسشنامه‌ای برای کسب اطلاعات بیشتر در DNA مورد بیماری تکمیل می‌گردید. برای استخراج از نمونه‌ها، از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer Corporation) استفاده شد. برای تکثیر



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

هم‌چنین در مورد مالاسزیا فورفور قطعه‌ی ۵۵۷ جفت بازی حاصل از PCR، به‌وسیله‌ی آنزیم *AluI* به دو قطعه‌ی ۳۰۶ و ۲۵۱ جفت بازی، توسط آنزیم *BanI* به دو قطعه‌ی ۳۸۹ و ۱۶۸ جفت بازی و با آنزیم *MspI* به دو قطعه‌ی ۵۲۵ و ۳۲ جفت بازی تقسیم شده است.<sup>۶</sup>

قطعه‌ی ۴۷۷ جفت بازی PCR شده‌ی مالاسزیا گلوبوزا توسط به‌وسیله‌ی آنزیم *AluI* به سه قطعه‌ی ۲۴۰، ۲۲۱ و ۱۶ جفت بازی، توسط آنزیم *BanI* هضم‌نشده و با آنزیم *MspI* به دو قطعه‌ی ۴۴۷ و ۳۰ جفت بازی تقسیم شده است.<sup>۶</sup>



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

طول باندهای به‌دست‌آمده برای گونه‌ی مالاسزیا فورفور ۵۵۷، مالاسزیا آبتوسا ۵۵۴، مالاسزیا جاپونیکا ۵۲۸، مالاسزیا گلوبوزا ۴۷۷، مالاسزیا اسلوفیئی ۵۰۵، مالاسزیا پکی درماتیس ۵۲۹، مالاسزیا سیمپودیالیس ۴۲۰، مالاسزیا یاماتوئنسیس ۴۷۰، مالاسزیا درماتیس ۴۲۸، مالاسزیا رستریکتا ۴۶۳ و مالاسزیا نانا ۴۱۶ جفت باز می‌باشد.<sup>۶</sup>

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

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

(٪۵) مشاهده شد و در ۲۴ بیمار (٪۴۰) هیچ یک از موارد فوق مشاهده نگردید. با استفاده از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی ملاسزیا و سن مشاهده نشد ( $P=0,2$ ). همچنین ابتلا در ۳۲ بیمار (٪۵۳,۳) برای بار اول بوده و ۲۸ بیمار (٪۴۶,۷) عود داشته‌اند. گونه‌های *M. furfur* و *M. globosa* در گروه مردان بیشتر از گروه زنان و گونه‌ی *M. sympodialis* در گروه زنان بیشتر از گروه مردان مشاهده شد. در گروه زنان، بیشترین فراوانی گونه‌ها مربوط به گونه‌های *M. globosa* و *M. sympodialis* و در گروه مردان، بیشترین فراوانی مربوط به گونه‌های *M. furfur* و *M. globosa* بود. از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی ملاسزیا و جنس بیماران مشاهده شد (جدول ۲) ( $P=0,02$ ).

### بحث

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

از میان ۶۰ نمونه‌ی مثبت به دست آمده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر، حدود ٪۳۰ ملاسزیا گلوبوزا، ٪۳۶,۶۷ ملاسزیا فورفور و ٪۲۰ ملاسزیا سیمپودیالیس جداسازی شد. این نشان می‌دهد که برخلاف اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی در دنیا که ملاسزیا گلوبوزا/ گونه‌ی غالب در بیماران است<sup>۱۵-۱۷</sup>، در این مطالعه‌ی ملاسزیا فورفور گونه‌ی غالب در

جدول ۱: توزیع فراوانی گونه‌های ملاسزیا در نمونه مبتلايان به پیتیریازیس و رسیکالر به روش PCR-RFLP

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

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

از ۵۷ بیماری که اطلاعات مربوط به فرم بالینی برای آن‌ها ثبت شده بود، فرم بالینی ۴۵ بیمار (٪۷۹) به صورت هایپرپیگمانته و در ۱۲ بیمار (٪۲۱,۰) به صورت هایپوپیگمانته بود. با استفاده از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین نوع گونه‌ی ملاسزیا و فرم بالینی مشاهده نشد ( $P=0,2$ ).

در این پژوهش، وجود عوامل مستعد‌کننده‌ی پیتیریازیس و رسیکالر از جمله تعریق زیاد، ابتلا به دیابت شیرین، بارداری، نقص ایمنی و مصرف استروئید بررسی گردید. تعریق زیاد در ۳۱ بیمار (٪۵۱,۶۷)، دیابت شیرین در ۳ بیمار (٪۵)، بارداری در ۲ بیمار (٪۳,۳۳)، مصرف استروئید در ۳ بیمار

جدول ۲: توزیع فراوانی گونه‌های ملاسزیا براساس جنس بیماران

جنس	<i>M. globosa</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. sympodialis</i>	ساير گونه‌ها	کل
زن	۵	۳	۳	۸	۱	۲۰
مرد	۱۳	۱۹	۲	۴	۲	۴۰
کل	۱۸	۲۲	۵	۱۲	۳	۶۰

این بررسی نیز با مطالعه‌ی ما متفاوت بود و ملاسزیا گلوبوza از شیوع بیشتری برخوردار بود. در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ در اندونزی بر روی ۹۸ بیمار مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر انجام گرفت بیشترین میزان شیوع را گونه‌ی ملاسزیا فورفور (۴۲٪) تشکیل می‌داد.<sup>۳</sup> که مشابه نتایج ما بود.

از جمله مطالعات انجام شده برای تشخیص گونه‌های ملاسزیا به روش مولکولی، مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۰۵ میرهندی و همکارانش برای شناسایی گونه‌های ملاسزیا از روش PCR-RFLP با *BstF51* و *Cfo1* دو آنزیم تحریکی<sup>۴</sup> انجام دادند. این روش قادر به شناسایی ۱۱ گونه‌ی استاندارد ملاسزیا و هم ۱۳ مورد از نمونه‌های بالینی بود و آن‌ها نتیجه را با تعیین تراالف DNA نیز تأیید کردند.<sup>۲۱</sup>

در سال ۲۰۰۶ Gaitanis و همکارانش از PCR-RFLP ناحیه‌ی ITS2 برای شناسایی ۱۱ گونه‌ی ملاسزیا استفاده کردند. این روش ساده، با ثبات و

تکرارپذیر بود و با DNA استخراج شده از پوسته قابل انجام بود.<sup>۵</sup> در مطالعه‌ی حاضر از همین روش برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد زیرا هزینه و زمان لازم برای شناسایی گونه‌های ملاسزیا با استفاده از آن کاهش می‌یابد.

در سال‌های اخیر توسعه‌ی روش‌های مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی دوست ملاسزیا را فراهم نموده است.<sup>۲۲</sup><sup>۲۳</sup> با وجود این روش‌های رایج و متداول قدیمی به عنوان خصوصیتی کلیدی در تشخیص اولیه‌ی گونه‌های ملاسزیا استفاده می‌شود.

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

بیماران می‌باشد. در تحقیق Aspiroz در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا بر روی ۷۹ بیمار مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر، ملاسزیا گلوبوza و سیمپودیالیس بیشترین موارد جداشده از بیماران بودند.<sup>۱۵</sup> ناکابایاشی در سال ۲۰۰۲ برای شناسایی گونه‌های ملاسزیا در بیماران مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر و درماتیت سبورئیک از تست تؤین استفاده نمود. در موارد درماتیت سبورئیک ملاسزیا گلوبوza و ملاسزیا فورفور به ترتیب بیشترین گونه‌های جداشده را تشکیل می‌دادند. در تعدادی از بیماران چند گونه‌ی ملاسزیا به‌طور هم‌زمان از ضایعات جدا گردید<sup>۱۶</sup> که چنین حالتی در بیماران مورد مطالعه‌ی ما دیده نشد. در سال ۲۰۰۶ در یونان Gaitanis و همکارانش شیوع گونه‌های ملاسزیا را در دو بیماری پیتیریازیس و رسیکالر و درماتیت سبورئیک بررسی کردند. بیشترین گونه‌های جداشده ملاسزیا گلوبوza و ملاسزیا رستریکتا به ترتیب با ۷۷٪ و ۳۹٪ به تنها ی و ۱۳٪ و ۱۸٪ همراه با گونه‌های دیگر بودند.<sup>۱۳</sup> در سال ۲۰۰۹ کلاراکاس و همکارانش در آدانای ترکیه گونه‌های ملاسزیا را در ۹۷ بیمار مبتلا به پیتیریازیس و رسیکالر شناسایی کردند. از ۹۷ مورد پوسته‌ی کشت داده شده روی محیط تغییریافته (modified) دیکسون، تنها ۴۴ مورد رشد داشتند. ملاسزیا گلوبوza با ۴۷٪ بیشترین موارد را تشکیل می‌داد و بعد از آن ملاسزیا فورفور (۳۶٪) و ملاسزیا اسلوفیئی (۱۵٪) قرار داشتند. در هیچ یک از موارد چند گونه‌ی ملاسزیا از یک بیمار جدا گردید<sup>۱۸</sup> که این حالت با مطالعه‌ی ما هم‌خوانی داشت. راثی در سال ۲۰۱۰ میزان شیوع گونه‌های ملاسزیا را در ضایعات پیتیریازیس و رسیکالر در تهران بررسی نمود. از ۱۶۶ شرکت‌کننده در تحقیق ۱۱۶ مورد کشت مثبت داشتند. ملاسزیا گلوبوza در ۳۱٪، ملاسزیا فورفور ۵٪، ملاسزیا پکی درماتیس ۲٪، ملاسزیا رستریکتا ۲٪ و ملاسزیا اسلوفیئی در ۳٪ موارد جدا شد.<sup>۱۹</sup> نتایج

برای این منظور کاملاً مناسب بود. در ضمن همان‌طور که در بررسی‌های گذشته ذکر شده، سه ناحیه‌ی ITS1، ITS2 و IGS1 بهترین پتانسیل را برای تایپینگ گونه‌های مالاسزیا دارند<sup>۸</sup> که در مطالعه‌ی ما ناحیه‌ی ITS2 مورد استفاده قرار گرفت.

شیمیابی را می‌دهد، شکستن و تخریب دیواره‌ی سلولی مخمر به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. از این رو در تحقیق حاضر مرحله‌ی تخریب دیواره‌ی سلولی طی زمان انکوباسیون طولانی سلول‌های مخمری در آنزیم DNA با فر لیزکننده، انجام گرفت و کیت استخراج ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction

## References

- Emami M, Kordbacheh P, Moghadami M, Zeini F, Medical Mycology. 4th ed. Tehran: 1999; pp. 97-9.
- Dorn M, Roehnert K. Dimorphism of *Pityrosporum orbicular* in a defined culture medium. J Invest Dermatol 1977; 62: 244-8.
- Gupta AK, Kohlt Y. Epidemiology of malassezia yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. Med Mycol 2001; 39: 199-206.
- Rippon JW. Medical mycology. 3<sup>rd</sup> Ed. Philadelphia. Saunders, 1988; P. 155.
- Zeini F, Mahbod AA, Emami M. Medical Mycology. 1<sup>st</sup> Ed. Tehran. Tehran University of Medical Sciences Publications, 2001; P. 64.
- Gaitanis G. Verifiable single nucleotide polymorphisms of the internal transcribed spacer 2 region for the identification of 11 Malassezia species. J of Dermatol Sci 2006; 43: 214-217.
- Inamadar AC. The genus Malassezia and human disease. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2003; 69: 265-70.
- Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. The range of molecular methods for typing Malassezia. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 119-25.
- Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of Malassezia microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. J Invest Dermatol 2008; 128: 345-51.
- Theelen B, Silvestri M, Gue'ho E, et al. Identification and typing of Malassezia yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Res 2001; 1: 79-86.
- Yamada Y, Makimura K, Ueda K, et al. DNA base alignment and taxonomic study of genus Malassezia based upon partial sequences of mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene. Microbiol Immunol 2003; 47: 475-8.
- Cafarchia C, Stefania Latrofa M, Testini G, et al. Molecular characterization of Malassezia isolates from dogs using three distinct genetic markers in nuclear DNA. Mol Cell Probes 2007; 21: 229-38.
- Gaitanis G. Distribution of Malassezia species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. British J of Dermatol 2006; 154: 854-9.
- Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, et al. Identification of Malassezia species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 162-73.

15. Aspiroz C. Isolation of *Malassezia globosa* and *M. sympodialis* from patients with pityriasis versicolor in Spain. *Mycopathologia* 2002; 154:111-7.
16. Nakabayashi A. Identification of causative species in *Malassezia*-associated dermatoses. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43:65-8.
17. Dutta S, Bajaj AK, Basu S, Dikshit A. Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycological study in India. *Int J Dermatol* 2002; 41: 823-4.
18. Karakaş M, Turaç-Biçer A, İlkit M, et al. Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey. *J Dermatol* 2009; 36: 377-82.
19. Rasi A, Naderi R, Behzadi AH, et al. *Malassezia* yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study. *Mycoses* 2010; 53: 350-5.
20. Krisanty RI, Bramono K, Made Wisnu I. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics. *Mycoses* 2009; 52: 257-62.
21. Mirhendi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61:281-4.
22. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, et al. Differentiation of *Malassezia* species: Selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 1997; 137: 208-13.
23. Affes M, Salah SB, Makni F, et al. Molecular identification of *Malassezia* species isolated from dermatitis affections. *Mycoses* 2009; 52: 251-6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Corresponding Author:**

Akram MirAmin Mohammadi, MSc

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

**Conflict of interest:** None to declare