مقاله‌ی پژوهشی

شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* در بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک با استفاده از روش PCR-RFLP

دکتر مهناز محمودی‌راد[1]
اکرم میرامین محمدی[2]
دکتر پرویز طوسی[1]
دکتر علیرضا فیروز[2]
سیدابراهیم اسکندری[2]
نیکی محمودی‌راد[1]
یاسمن میردامادی[1]
دکتر امیرهوشنگ احسانی[3]
زینب قاسمی[3]
شیما یونس‌پور[1]

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.

نویسنده‌ی مسئول:

اکرم میرامین محمدی
تهران، خیابان طالقانی غربی، شماره‌ی ۴۱۵، کدپستی: ۱۴۱۶۶۱۳۶۷۵، پست الکترونیک: miramin48@yahoo.com

تعارض منافع: اعلام نشده است.

زمینه و هدف: مالاسزیا قارچی دوشکلی و چربی‌دوست است که دارای گونه‌های مختلفی می‌باشد. بعضی از آن‌ها به صورت فلور طبیعی روی پوست وجود دارند و در شرایطی ایجاد بیماری می‌کنند. هدف اصلی از این مطالعه، بررسی گونه‌های *مالاسزیا* در موارد درماتیت سبورئیک با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP بود.

روش اجرا: از در این مطالعه‌ی توصیفی، ۷۰ نمونه‌ی جداشده از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به درماتیت سبورئیک مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR-RFLP انجام شد. در این روش ناحیه‌ی Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) توسط پرایمرهای ITS3 و ITS4 تکثیر گردید و توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی AluI، BanI و MspAI قطعات مشخصی برای هر گونه‌ی *مالاسزیا* به‌دست آمد.

یافته‌ها: گونه‌های جداشده از بیماران به ترتیب *مالاسزیا گلوبوزا* (۴۸/۶٪)، *مالاسزیا فورفور* (۴۰/۰٪)، *مالاسزیا اسلوفیئی* (۸/۶٪) و *مالاسزیا سیمپودیالیس* (۲/۸٪) بودند. هیچ موردی از *M. pachydermatis*، *M. japonica*، *M. dermatis*، *M. restricta*، *M. obtusa*، *M. nana* و *M. yamatoensis* از نمونه‌ها جدا نشد.

نتیجه‌گیری: شایع‌ترین گونه‌ی ایزوله‌شده از ضایعات درماتیت سبورئیک، *مالاسزیا گلوبوزا* و پس از آن *مالاسزیا فورفور* بود.

کلیدواژه‌ها: مالاسزیا، درماتیت سبورئیک، PCR-RFLP

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۱
پوست و زیبایی؛ تابستان ۱۳۹۰، دوره‌ی ۲ (۲): ۱۰۵-۹۸

مقدمه

درماتیت سبورئیک یک درماتیت مزمن است که در آن پوسته‌های چرب هم در نوزادان و هم در بالغین مشاهده می‌شوند. در بالغین، بثورات تمایل دارند بر روی قسمت‌های مرکزی صورت، ابروها و سر ظاهر شده و اغلب باعث پوسته‌دارشدن پوست می‌گردند. درماتیت سبورئیک، هم‌چنین می‌تواند در زیر بغل، کشاله‌ی ران یا وسط قفسه‌سینه به‌وجود آید.

در مردان این وضعیت گاهی در نواحی رویش ریش ایجاد می‌شود. علت این بیماری نامشخص است، اما درماتیت سبورئیک گاهی با رشد بیش از حد مالاسزیا، مخمری که به‌طور طبیعی بر سطح پوست وجود دارد، مرتبط است. این قارچ عامل بیماری پیتیریازیس ورسیکالر است و در پاتوژنز درماتیت سبورئیک، درماتیت اتوپیک و پسوریازیس نقش دارد.

درماتیت سبورئیک با درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچ بهتر می‌شود و این نکته مطرح‌کننده‌ی این احتمال است که قارچ‌های مخمری پوست در ایجاد این بیماری دخالت دارند. اتیولوژی دقیق بیماری ناشناخته است ولی بیش از یک دهه است که همراهی این درماتوز با مخمر مالاسزیا شناخته شده است[۱]. این مخمر لیپوفیل می‌باشد و نواحی غنی از سبوم باعث سهولت رشد آن می‌شوند[۱و۲]. درصد کمی از افرادی که این مخمر را در پوست خود دارند مبتلا به درماتیت سبورئیک می‌گردند. گرچه مکانیسم دقیق آن شناخته نشده است اما یک نظریه علت این امر را پاسخ غیرطبیعی میزبان به این مخمر می‌داند[۲و۳]، زیرا بسیاری از افراد سالم، آنتی‌بادی علیه مالاسزیا دارند. برخی از مؤلفین معتقدند سطح آنتی‌بادی در افراد مبتلا به درماتیت سبورئیک بالاتر است ولی برخی دیگر این نظریه را قبول ندارند. اخیراً پیشنهاد شده است که درماتیت سبورئیک به علت یک واکنش تحریکی به مالاسزیا ایجاد می‌شود که باعث پاسخ التهابی می‌گردد[۳]. شوره‌ی سر ۲۵٪ موارد درماتوزهای پوست سر را به خود اختصاص می‌دهد[۴]. شوره‌ی سر و درماتیت سبورئیک شدت‌های متفاوت یک بیماری می‌باشند (شوره‌ی سر فرم ضعیف بیماری است) لذا قابل پیش‌بینی است که عوامل ضد قارچی مؤثر در درمان درماتیت سبورئیک در درمان شوره‌ی سر هم مؤثر باشند[۱]. دو گروه دارویی مهم در درمان درماتیت سبورئیک؛ کورتیکواستروئیدهای موضعی و عوامل ضد قارچی می‌باشند[۳]. اما امروزه به علت عوارض جانبی کورتیکواستروئیدهای موضعی، اقدامات درمانی بیشتر به طرف عوامل ضد قارچی متمایل شده‌اند.

در سال‌های گذشته هفت گونه‌ی از مالاسزیا شامل *مالاسزیا فورفور*، *مالاسزیا اسلوفیئی*، *مالاسزیا گلوبوزا*، *مالاسزیا سیمپودیالیس*، *مالاسزیا پکی‌درماتیس*، *مالاسزیا رستریکتا* و *مالاسزیا ابتوسا* با روش‌های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی شناخته شده که در نواحی مختلف جهان میزان شیوع متفاوتی از آن‌ها گزارش گردیده است[۴و۵]. اخیراً چهار گونه‌ی دیگر شامل *مالاسزیا درماتیس*، *مالاسزیا جاپونیکا*، *مالاسزیا نانا* و *مالاسزیا یاماتوئنسیس* به گونه‌های جنس *مالاسزیا* افزوده شده است و ارتباط آن‌ها با بیماری‌های پوستی در دست بررسی می‌باشد[۵]. گونه‌های *M. sympodialis* و *M. restricta* شایع‌ترین گونه‌های *مالاسزیا* در ضایعات درماتیت سبورئیک هستند[۶].

روش‌هایی که برای طبقه‌بندی مولکولی گونه‌های *مالاسزیا* 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 *مالاسزیا* 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[۵-۱۲].

در آینده‌ی نزدیک، تایپینگ مولکولی بهترین وسیله برای مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد بود و توسط این روش‌ها می‌توان پاتوبیولوژی گونه‌های *مالاسزیا* را در ارتباط با بیماری‌های پوستی توضیح داد[۵].

در این بررسی از روش PCR-RFLP برای شناسایی و مقایسه‌ی گونه‌های *مالاسزیا* در پوسته‌های جداشده از بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک استفاده شده است. این روش می‌تواند یازده گونه‌ی *مالاسزیا* را در نمونه‌ی پوسته‌ی بیماران شناسایی کند[۵].

روش اجرا

این مطالعه که از دی‌ماه ۱۳۸۷ به مدت یک سال انجام گرفت روی ۷۹ بیمار مبتلا به درماتیت سبورئیک به درمانگاه پوست بیمارستان شهدای دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام و بیمارستان رازی دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. از

این افراد توسط اسکالپل استریل نمونه‌ی پوسته تهیه، و در پاکت‌های سیاه جمع‌آوری شد. هم‌چنین سه سویه‌ی *مالاسزیا فورفور* (CBS9577)، *مالاسزیا سیمپودیالیس* (CBS7222) و *مالاسزیا گلوبوزا* (CBS7874) به‌عنوان 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 مورد بیماری تکمیل می‌گردید. برای استخراج DNA از نمونه‌ها، از کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer Corporation) استفاده شد. برای تکثیر DNA استخراج شده، به هر میکروتیوبِ کیت PCR، میزان دو میکرولیتر از DNA استخراج شده و چهار میکرولیتر از مخلوط آماده شده از دو پرایمر یونیورسال با سکانس‌های زیر افزوده می‌شد:

ITS3 (5́-GCATCGATCAAGAACGCAGC-3́) و ITS4 (5́-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3́).

حجم مخلوط 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 دمای 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 *Alu*I، *Ban*I و *Msp*AI، قطعات مشخصی برای هر یک از گونه‌های *مالاسزیا* به‌وسیله‌ی ژل الکتروفورزیسِ محصول هضم‌شده توسط آنزیم‌ها به‌دست آمد که بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید این قطعات قابل مشاهده بودند.

یافته‌ها

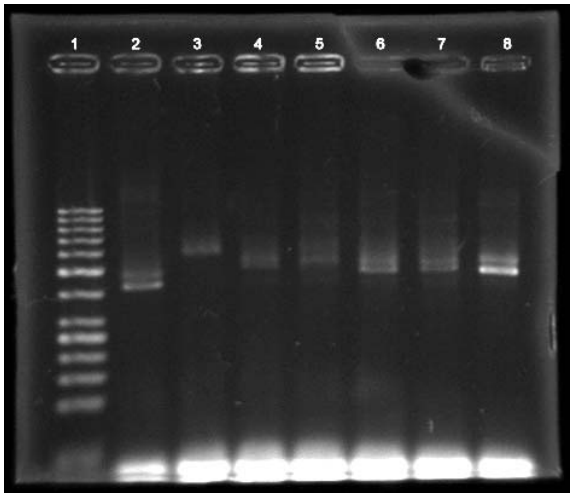
از ۷۹ بیمار تحت مطالعه، ۹ بیمار (۱۱/۴٪) از نظر مالاسزیا منفی بودند و از مطالعه کنار گذاشته شدند. از ۷۰ بیمار باقیمانده مبتلا به درماتیت سبورئیک، ۳۵ بیمار (۵۰٪) مرد بودند و میانگین، انحراف معیار و میانه‌ی سن بیماران به ترتیب ۲۶/۴۷ و ۱۰/۰۱ و ۲۵/۵ سال و (دامنه سنی ۷۵-۱۲ سال) بود.

طول باندهای به‌دست آمده برای گونه‌ی *مالاسزیا فورفور* ۵۵۷، *مالاسزیا آبتوسا* ۵۵۴، *مالاسزیا جاپونیکا* ۵۲۸، *مالاسزیا گلوبوزا* ۴۷۷، *مالاسزیا اسلوفیئی* ۵۰۵، *مالاسزیا پکی‌درماتیس* ۵۲۹، *مالاسزیا سیمپودیالیس* ۴۲۰، *مالاسزیا یاماتوئنسیس* ۴۷۰، *مالاسزیا درماتیس* ۴۱۶، *مالاسزیا رستریکتا* ۴۶۳ و *مالاسزیا نانا* ۴۲۸ جفت باز می‌باشد[۵].

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

همان‌طور که در تصویر شماره‌ی ۲ دیده می‌شود قطعه‌ی ۵۰۵ جفت بازیِ PCR شده‌ی *مالاسزیا اسلوفیئی* توسط آنزیم *Alu*I به دو قطعه‌ی ۳۸۵ و ۱۲۰ جفت بازی و توسط آنزیم *Msp*AI به دو قطعه‌ی ۴۲۷ و ۳۳ جفت باندی شکسته شده است ولی آنزیم *Ban*I تأثیری روی قطعه‌ی PCR شده ندارد[۵].

در مورد *مالاسزیا سیمپودیالیس* قطعه‌ی ۴۲۰ جفت بازی حاصل از PCR، تنها به‌وسیله‌ی آنزیم *Msp*AI به سه قطعه‌ی ۲۸۱، ۱۰۹ و ۳۰ جفت بازی تقسیم شده است و دو آنزیم دیگر ناحیه‌ای برای شکستن در قطعه‌ی PCR شده ندارند[۵].

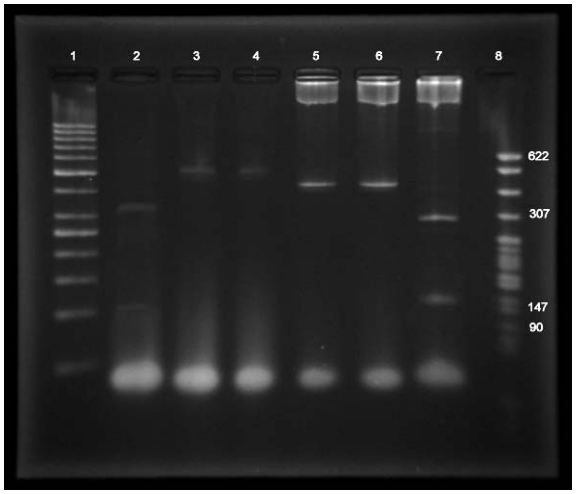


تصویر ۱: نمونه‌های بیمار در کنار یک مارکر و یک *مالاسزیا گلوبوزای* شاهد در ژل آگاروز الکتروفورز شده‌اند: ردیف ۱ مارکر ۵۰bp، ردیف ۲ *مالاسزیا سیمپودیالیس* (جداشده از نمونه‌ی بالینی)، ردیف ۳ *مالاسزیا اسلوفیئی* (جداشده از نمونه‌ی بالینی)، ردیف ۴ کنترل *مالاسزیا گلوبوزا* (نمونه‌ی استاندارد، CBS7874) و ردیف‌های ۵ تا ۸ *مالاسزیا گلوبوزا* (جداشده از نمونه‌های بالینی).

جدول ۱، توزیع فراوانی گونه‌های *مالاسزیا* در نمونه‌ی بالینی مبتلایان به درماتیت سبورئیک را نشان می‌دهد. در بیماران تحت مطالعه، گونه‌های *مالاسزیای M. pachydermatidis*، *M. japonica*، *M. dermatis*، *M. nana*، *M. obtusa*، *M. restricta* و *M. yamatoensis* مشاهده نشد.

از ۷۰ بیمار تحت مطالعه، در ۶۸ بیمار (۹۷/۱٪) شکل بالینی به‌صورت پوسته‌ریزی و در ۱۱ بیمار (۱۵/۷٪) به‌صورت لکه‌های قرمز مشاهده شد.

در این پژوهش، وجود عوامل مستعدکننده‌ی درماتیت سبورئیک از جمله مصرف استروئید، نقص ایمنی، ابتلا به بیماری صرع، مصرف الکل، ابتلا به بیماری پارکینسون و فلج عصب صورت بررسی گردید. مصرف استروئید در ۳ بیمار (۴/۳٪)، اپی‌لپسی در یک بیمار (۱/۴٪)، پارکینسون در یک بیمار (۱/۴٪) مشاهده شد و در ۶۵ بیمار (۹۲/۹٪) هیچ یک از موارد فوق مشاهده نگردید.



تصویر ۲: دو نمونه مالاسزیای جداشده از دو بیمار بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR توسط سه اندونوکلئاز تحدیدی *Alu*I، *Ban*I و *Msp*AI در کنار دو مارکر مشاهده می‌شوند. ردیف ۱ مارکر ۵۰bp، ردیف ۲ *مالاسزیا اسلوفیئی* *Alu*I، ردیف ۳ *مالاسزیا اسلوفیئی* *Ban*I، ردیف ۴ *مالاسزیا اسلوفیئی* *Msp*AI، ردیف ۵ *مالاسزیا سیمپودیالیس* *Alu*I، ردیف ۶ *مالاسزیا سیمپودیالیس* *Ban*I، ردیف ۷ *مالاسزیا سیمپودیالیس* *Msp*AI و ردیف ۸ مارکر pBR322 *Msp*I digest می‌باشد.

۴۸/۶٪ موارد بیماری در گروه سنی ۲۱ تا ۳۰ سال و ۲۸/۶٪ موارد بیماری در گروه سنی ۱۰ تا ۲۰ سال دیده شد که این نشان می‌دهد این بیماری در افراد زیر ۳۰ سال بیشتر مشاهده می‌شود (۷۷/۱٪). در همه‌ی گروه‌های سنی بیشترین عامل ایجاد بیماری *مالاسزیا گلوبوزا* بود. با استفاده از آزمون مربع کای رابطه‌ی معنی‌داری بین گونه‌ی *مالاسزیا* و جنس بیماران

جدول ۱: توزیع فراوانی گونه‌های *مالاسزیا* در نمونه‌ی بالینی مبتلایان به درماتیت سبورئیک به روش PCR-RFLP

گونه‌های *مالاسزیا*	فراوانی	درصد
M. globosa	۳۴	۴۸/۶
M. furfur	۲۸	۴۰/۰
M. slooffiae	۶	۸/۶
M. sympodialis	۲	۲/۸
جمع کل	۷۰	۱۰۰

جدول ۲. توزیع فراوانی گونه‌های مالاسزیا به تفکیک نواحی مختلف بدن

نواحی مختلف بدن	گونه‌های مالاسزیا				کل
	M. globosa	*M. furfur*	*M. slooffiae*	*M. sympodialis*	
سر	۳۲	۲۷	۶	۲	۶۷
سینه	۱	–	–	–	۱
پشت	۱	۱	–	–	۲
صورت	۷	۳	۲	–	۱۲
زیر بغل	–	۱	۱	–	۲
کل	۳۴	۲۸	۶	۲	۷۰

مشاهده نشد (P=۰/۸۱). فراوانی گونه‌های مختلف *مالاسزیا* به تفکیک نواحی بدن در جدول ۲ نشان داده شده است.

بحث

در این تحقیق از روش PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* و بررسی انواع شایع آن در ایران استفاده گردید. نتایج نشان داد که روش PCR-RFLP برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* بسیار ساده و مناسب می‌باشد.

از میان ۷۰ نمونه‌ی مثبت به‌دست آمده از بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک، حدود ۴۸/۶٪ *مالاسزیا گلوبوزا* و ۴۰٪ *مالاسزیا فورفور* و ۸/۶٪ *مالاسزیا اسلوفیئی* جداسازی شد. این نشان می‌دهد که مانند اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی در دنیا، *مالاسزیا گلوبوزا* گونه‌ی غالب در این بیماران می‌باشد. بر خلاف آنچه که در مقاله‌ی مروری Inamadar در سال ۲۰۰۳ آمده تعداد *مالاسزیا سیمپودیالیس* در بررسی ما بر روی بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک، تنها دو مورد (۲/۸٪) بود و موردی از *مالاسزیا رستریکتا* از بیماران جدا نگردید[۶و۱۳]. در سال ۲۰۰۶ Sugita و همکارانش تعداد مالاسزیاهای پوست را در موارد درماتیت اتوپیک توسط PCR-RFLP شمارش کردند. در هفت مورد از دوازده مورد تعداد مالاسزیاهای کلونیزه شده در ناحیه‌ی سر و گردن در مقایسه با ناحیه‌ی تنه و اعضا افزایش نشان می‌داد و گونه‌های *مالاسزیا گلوبوزا* و *مالاسزیا رستریکتا* ۸۰٪ موارد کلونیزاسیون را تشکیل می‌دادند[۱۴]. در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان موارد ابتلا سر بیشتر از سایر اعضا بود و گونه‌ی غالب همانند مطالعه‌ی سوگیتا *مالاسزیا گلوبوزا* بود اما *مالاسزیا رستریکتا* جدا نگردید. در تحقیق Aspiroz در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا بر روی ۷۹ بیمار مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر، *مالاسزیا گلوبوزا* و *سیمپودیالیس* بیشترین موارد جداشده از بیماران بودند[۱۵]. ناکاباياشی در سال ۲۰۰۲ برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* در بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبورئیک از تست توئین استفاده نمود. در موارد درماتیت سبورئیک *مالاسزیا گلوبوزا* و *مالاسزیا فورفور* بیشترین گونه‌های جداشده را تشکیل می‌دادند. در تعدادی از بیماران، چند گونه‌ی *مالاسزیا* به‌طور هم‌زمان از ضایعات جدا گردید[۱۶] که چنین حالتی در بیماران مورد مطالعه‌ی ما دیده نشد. از جمله مطالعات انجام شده برای تشخیص گونه‌های *مالاسزیا* به روش مولکولی مطالعه‌ای است که در سال ۲۰۰۵ میرهندی و همکارانش برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* به روش PCR-RFLP با دو آنزیم تحدیدی *Cfo*1 و *Bst*F51 انجام دادند. این روش قادر به شناسایی ۱۱ گونه‌ی استاندارد *مالاسزیا* و ۱۳ مورد از مالاسزیاهای جداشده از نمونه‌های بالینی بود و آن‌ها نتیجه را با تعیین ترادف DNA نیز تأیید کردند[۱۷]. در این روش از مخمرهای کشت داده شده جهت استخراج

DNA استفاده گردید. در سال ۲۰۰۶ Gaitanis و همکارانش از PCR-RFLP ناحیه‌ی ITS2 برای شناسایی ۱۱ گونه‌ی *مالاسزیا* استفاده کردند. این روش ساده، با ثبات و تکرارپذیر بود و با DNA استخراج شده از پوسته قابل انجام بود[۵].

در مطالعه‌ی حاضر از همین روش برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد زیرا هزینه و زمان لازم برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* با استفاده از آن کاهش می‌یابد. در سال ۲۰۰۶ در یونان Gaitanis و همکارانش شیوع گونه‌های *مالاسزیا* را در دو بیماری پیتیریازیس ورسیکالر و درماتیت سبورئیک بررسی کردند. بیشترین گونه‌های جداشده‌ی *مالاسزیا گلوبوزا* و *مالاسزیا رستریکتا* به ترتیب با ۷۷٪ و ۳۹٪ به تنهایی و ۱۳٪ و ۱۸٪ همراه با گونه‌های دیگر بودند[۱۲]. در سال ۲۰۱۰ در بوسنی و هرزگوین، Prohic گونه‌های *مالاسزیا* را از طریق شکل ظاهری و مشخصات فیزیولوژیک آن‌ها در چهل بیمار مبتلا به درماتیت سبورئیک شناسایی نمود. *مالاسزیا رستریکتا* ۲۷/۵٪، *مالاسزیا گلوبوزا* ۱۷/۵٪ و *مالاسزیا اسلوفیئی* ۱۵٪ موراد جداشده را تشکیل می‌دادند[۱۸].

توسعه‌ی روش‌های مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی‌دوست *مالاسزیا* را فراهم نمود[۱۹-۲۱]. با وجود این روش‌های رایج و متداول قدیمی هنوز هم به‌عنوان خصوصیتی کلیدی در تشخیص اولیه‌ی گونه‌های *مالاسزیا* استفاده می‌شوند.

تخریب دیواره‌ی سلولی DNA اصلی‌ترین مرحله‌ی استخراج مخمرهاست. از آن‌جا که جنس *مالاسزیا* دارای دیواره‌ی سلولی چند لایه‌ای است که به آن توانایی مقاومت بالا در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی را می‌دهد، شکستن و تخریب دیواره‌ی سلولی مخمر به سادگی امکان‌پذیر نیست. از این رو در تحقیق حاضر مرحله‌ی تخریب دیواره‌ی سلولی طی زمان انکوباسیون طولانی سلول‌های مخمری در آنزیم و بافر لیزکننده، انجام گرفت و کیت استخراج DNA ژنومی (AccuPrp® Genomic DNA Extraction Kit, Bioneer) 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[۷] که در مطالعه‌ی ما ناحیه‌ی ITS2 مورد استفاده قرار گرفت.

References

1. Rippon JW. Medical mycology. 3rd Ed. Philadelphia: Saunders; 1988. P. 155.
2. Zeini F. Mahbod AA. Emami M. Medical mycology. 4th Ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Publications, 1998;, pp: 64.
3. Dorn M, Rocehnert K. Dimorphism of Pityrosporum orbicular in a defind culture medium. J Invest Dermatol 1977; 62: 244-8.
4. Gupta AK, Kohlt Y. Epidemiology of malassezia yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada. Med Mycol 2001; 39: 199-206.
5. Gaitanis G. Verifiable single nucleotide polymorphisms of the internal transcribed spacer 2 region for the identification of 11 Malassezia species. J Dermatol Sci 2006; 43: 214-7.
6. Inamadar AC. The genus Malassezia and human disease. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2003; 69: 265-70.
7. Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. The range of molecular methods for typing Malassezia. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 119-25.
8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Gaitanis G. 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, 854-9.

13. Parry ME, Sharpe GR. Seborrhoeic dermatitis is not caused by an altered immune response to Malassezia yeast. Br J Dermatol 1998; 139: 254-63.

14. Sugita T. Quantitative analysis of cutaneous Malassezia in atopic dermatitis patients using real-time PCR. Microbiol Immunol 2006; 50: 549-52.

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. Mirhendi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiol Methods 2005; 61: 281-4.

18. Prohic A. Distribution of Malassezia species in seborrhoeic dermatitis: correlation with patients' cellular immune status. Mycoses 2010; 53: 344-9.

19. Nakamura Y, Kano R, Murai T, et al. Susceptibility testing of Malassezia species using the urea broth microdilution method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 44: 2185-6.

20. 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.

21. 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 seborrheic dermatitis using PCR-RFLP

Mahnaz Mahmoudi Rad, PhD[1]
Akram Miramin Mohammadi, MSc[2]
Parviz Tousi, MD[1]
Amirhoushang Ehsani, MD[3]
Alireza Firooz, MD[2]
Yasaman Mirdamadi, MSc[1]
Seyyed Ebrahim Eskandari, MSc[2]
Niki Mahmoudi Rad, BSc[1]
Shima Younespour, MSc[1]
Zeinab Ghasemi, BSc[3]

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.

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

Methods: In this study out of 79 patients with seborrheic dermatitis, isolates of 70 patients were positive for *Malassezia* species using 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*AI were selected for producing distinct RFLP patterns.

Results: *M. globosa* (48.6%), *M. furfur* (40.0%), *M. slooffiae* (8.6%) and *M. sympodialis* (2.8%), were the microorganisms responsible for the infection among participants. *M. pachydermatis, M. japonica, M. dermatis, M. restricta, M. obtuse, M. nana and M. yamatoensis* were not isolated from any samples.

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

Keywords: *Malassezia*; seborrheic dermatitis; PCR-RFLP

Received: Feb 15, 2011 Accepted: May 22, 2011

Dermatology and Cosmetic 2011; 2 (2): 98-105

Corresponding Author:
Akram MirAmin Mohammadi, Msc

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

Conflict of interest: None to declare