

شناسایی و تشخیص گونه‌های شایع مالاسزیا در ایران با استفاده از روش RCR-RFLP

معصومه شمس^۱، سعید امانلو^{۲*}، مهدی فروزنده مقدم^۳، حسن میرزاحسینی^۴

- ۱- دکترای قارچ‌شناسی پزشکی، استادیار گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانش‌آموخته کارشناس ارشد قارچ‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دکترای بیوشیمی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دکترای بیوتکنولوژی، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: مخمرهای فرصت طلب جنس مالاسزیا متعلق به شاخه بازیدیومیکوتاه‌ها و خانواده کریپتوکوکاسه می‌باشند که به‌طور طبیعی روی پوست انسان و حیوانات خونگرم ساکن هستند. این مخمرها تحت شرایط خاصی قادر به ایجاد بیماری نظیر تینه آ و رسیکالر، درماتیت سبور،... و حتی عفونت‌های سیستمیک است. در سالهای اخیر در پی استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و روشهای مولکولی ۹ گونه از جنس مالاسزیا شناسایی شده است.

مواد و روشها: تحقیق اخیر با هدف به‌کارگیری روشهای PCR-RFLP برای شناسایی این گونه‌ها و بررسی سوش‌های شایع در ایران پایه‌ریزی شد. ابتدا نمونه‌های به‌دست آمده بر اساس تستهای متداول میکروسکوپی و ماکروسکوپی و خصوصیات بیوشیمیایی در حد گونه شناسایی شدند و در آزمایشات مولکولی الگوهای واحدی برای هر یک از ۳ گونه شایع مالاسزیا به‌دست آمد.

نتایج: قطعات تولیدی PCR در حدود ۶۰۰bp تا ۸۰۰bp طول داشتند. محصول PCR مالاسزیا سیمپودیالیس (bp ۶۰۰ تا ۷۰۰) کوچکتر از محصول PCR سایر گونه‌های مالاسزیا بود و از این رو به راحتی و تنها از روی باند مربوط به PCR که با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 به‌دست آمده، از سایر گونه‌های مالاسزیا قابل افتراق بود. محصول PCR دو گونه مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا فورفور کاملاً مشابه هم بوده و افتراق این دو گونه بر اساس قطعات تولیدی PCR ITS1/4 تقریباً غیر ممکن است. برای شناسایی و افتراق دو گونه مزبور از الگوی RFLP با آنزیم ECOR1 استفاده شد.

بحث: استفاده از روشهای مولکولی، شناسایی سریع و دقیق گونه‌های مختلف مالاسزیا را امکان‌پذیر می‌سازد. نتایج به‌دست آمده از روش RCR-RFLP با نتایج به‌دست آمده از روشهای متداول آزمایشگاهی، کاملاً مطابقت داشت.

کلید واژگان: شناسایی، مالاسزیا، چربی دوست، PCR، RFLP.

۱- مقدمه

مخمرهای فرصت طلب جنس مالاسزیا متعلق به شاخه بازیدیومیکوتاه‌ها،
رده هتروزیادیومیست‌ها، راسته اوستیلاجینالها، خانواده کریپتوکوکاسه^۴
هستند که به‌طور طبیعی روی پوست انسان و حیوانات خونگرم ساکن
می‌باشند [۱-۶].

* نشانی مکاتبه: زنجان، شهرک آزادگان، خیابان خرداد، قطعه ۴۴۳۵، تلفن: ۰۲۴۱-۴۲۱۳۶۶۵

E-mail: ama.myco@yahoo.com

1. Basidiomycota
2. Heterobasidiomycete
3. Ustilaginella
4. Cryptococcaceae

ایزوله‌ها ارزشمند است. اما در عفونت‌های سیستمیک شناسایی و بازیافت مخمرها در تشخیص صحیح و سریع ضروری به نظر می‌رسد [۱].

به منظور کشت ارگانسیم در محیط‌های مصنوعی استفاده از چربی به‌عنوان مکمل، ضروری است.

روغن زیتون و اسید اولئیک از محصولات طبیعی هستند که به‌عنوان مکمل چربی در محیط کشت استفاده می‌شوند. استفاده از توئین^{۱۷} در سال ۱۹۷۶ برای اولین بار معمول شد. افزودن توئین‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ در محیط خود تأییدی بر تفاوت تغذیه‌ای بین گونه‌های مختلف مالاسزیاست [۵، ۹].

۲- مواد و روشها

در این تحقیق نمونه‌های بالینی از مراجعه‌کنندگان به درمانگاه‌های پوست بیمارستان رازی تهران و درمانگاه تربیت مدرس که دارای علائم بالینی بیماری‌های تینه‌آوریسکالر و درماتیت سبوریه بودند و بیماری آنها به‌وسیله متخصصان پوست تأیید شده، در طی مدت ۳ ماه جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری به روش تراشیدن پوسته‌ها، انجام گرفت. در این روش پس از مشخص کردن محل ضایعه و ضدعفونی کردن موضع با الکل ۷۰ درصد، با استفاده از تیغ جراحی کند سطح ضایعات تراشیده و پوسته‌های حاصل از آن درون پلیت یکبار مصرف استریل جمع‌آوری شد. قسمتی از پوسته‌ها برای تهیه لام میکروسکوپی و بررسی مستقیم میکروسکوپی استفاده شد. به منظور بررسی مستقیم میکروسکوپی پوسته‌ها، ابتدا مقداری از پوسته‌های جمع‌آوری شده روی یک لام تمیز قرار داده و سپس با پتاس ۱۰ درصد شفاف شد و برای انجام آزمایش میکروسکوپی مورد استفاده قرار گرفت.

پس از مشاهده عناصر قارچی در بررسی‌های میکروسکوپی، بخش دیگری از پوسته‌ها برای کشت و شناسایی عوامل مخمری به محیط کشت دیکسون تغییر یافته (MDA)^{۱۸} منتقل و برای تهیه محیط کشت MDA از ترکیبات زیر استفاده شد.

عصاره مالت ۳/۶ گرم، پپتن ۰/۶ گرم، صفرای گاو ۲ گرم، توئین ۴۰ به مقدار ۱ میلی‌لیتر، گلیسرول ۲۰۰ میکرولیتر، اسید اولئیک ۲۰۰ میکرولیتر، آگار ۱/۲ گرم که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد.

پوسته‌ها به‌وسیله آنس استریل بر روی محیط MDA تازه تهیه شده به‌صورت نشاکاری در چند نقطه تلقیح و در دمای ۳۲

این مخمرها تحت شرایط خاصی قادر به ایجاد بیماری نظیر تینه آوریسکالر^۱، درماتیت سبوریه^۲، و ... می‌باشند و بتازگی به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب، عامل عفونت‌های مهاجم تشخیص داده شده‌اند [۱، ۶].

گونه‌های مالاسزیا تمایل زیادی به چربی به‌عنوان سوبسترا دارند، لذا از این ویژگی برای شناسایی آنها استفاده می‌شود. وجود دیواره سلولی چند لایه، توانایی تجزیه اوره، واکنش مثبت به‌دنبال رنگ‌آمیزی با رنگ دی‌آزونیوم بلو^۳ B و برآورد درصد گوانین + سیتوزین در DNA و آنالیز RNA ریبوزومی از نظر طبقه‌بندی آنها را جزء بازیدیومیست‌ها مطرح می‌کند. از جمله گونه‌های شناخته شده از جنس مالاسزیا، می‌توان به گونه‌های مالاسزیا فورفور^۴، مالاسزیا پاکی درماتیس^۵ و مالاسزیا سیمپودیالیس^۶ اشاره کرد که بین آنها مالاسزیا پاکی درماتیس به‌عنوان فلور نرمال انسان محسوب نمی‌شود؛ اما مکرراً از سگ‌های خانگی و سایر حیوانات جدا شده و قادر است بدون مکمل چربی رشد نماید [۱].

با استفاده از مطالعات مولکولی چهار گونه دیگر به نام‌های مالاسزیا گلوبوزا^۷، مالاسزیا ابتوزا^۸، مالاسزیا اسلوفیه^۹، و مالاسزیا رستریکتا^{۱۰} به‌وسیله گیهو^{۱۱}، میدجلی^{۱۲} و گیلوت^{۱۳} تا سال ۱۹۹۶ تعیین شده است [۱]. در سال‌های اخیر نیز در پی استفاده از روش‌های PCR-RFLP^{۱۴} و ... دو گونه مالاسزیا درماتیس^{۱۵} و مالاسزیا ژاپونیکا^{۱۶} به سایر گونه‌ها اضافه شده است [۷].

تشخیص اولیه گونه‌های مالاسزیا بر مشاهده مورفولوژی مخمر استوار است، به‌طوری‌که معرف جنس مربوطه می‌باشد. قدم بعدی در تشخیص، بررسی ویژگی‌هایی نظیر شکل کلنی و شکل سلول‌های مخمری است [۱، ۸]. به‌علت حضور طبیعی گونه‌های مالاسزیا روی پوست در تشخیص بیماری‌های مرتبط با مالاسزیا، کشت ارزش تشخیصی چندانی ندارد و تنها در مطالعات اپیدمیولوژیک و بررسی آثار ضد قارچی بر روی

1. Tinea Versicolor
2. Seborrheic dermatitis
3. Diazonium blue B
4. *M.furfur*
5. *M.pachydermatis*
6. *M.symphodialis*
7. *M.globosa*
8. *M.obtusa*
9. *M.slooffiar*
10. *M.restricta*
11. Gueho
12. Midgley
13. Guillot
14. Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis
15. *M.dermatis*
16. *M.japonica*

17. Tween

18. Modified Dixon Agar

با استفاده از Chelex انجام گرفت. هرچند میزان DNA استخراجی بالا بود؛ اما میزان ناخالصی پروتئینی و پلی ساکارید نیز بسیار بالا بود. از طرفی DNA استخراج شده به میزان زیادی خرد شده و قطعات کوچک DNA به صورت اسمیر در ژل الکتروفورز مشاهده می شد. از این رو روش ارائه شده در کیت استخراجی Core biosystem با ظرافت و دقت بیشتری برای کسب مقادیر بالای DNA انجام گرفت و مرحله نهایی شستشو با اتانل ۷۰ درصد در دو مرحله انجام شد تا ناخالصی پروتئین کاهش یابد. این کیت برای استخراج DNA ژنومی با وزن مولکولی (۵۰ kb تا ۱۰۰) از نمونه های خون، لنفوسیت های بافی کت^۴، سلول های کشت شده، بافت و سلول های باکتریال به کار می رود. در استفاده از این روش نیازی به فنل، کلروفرم و یا سایر ترکیبات آلی مورد نیاز برای استخراج DNA نیست. پس از استخراج DNA، محصول به دست آمده از نظر کمی و کیفی بررسی شد، تا در صورت مطلوب بودن محصول، مراحل بعدی کار انجام شود. در این پژوهش کیت PCR از کمپانی داخلی سیناژن تهیه شد. به طور کلی برای انجام واکنش PCR در یک واکنش ۱۰۰ میکرولیتری، از ترکیبات زیر استفاده شد:

۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰x، مقدار ۲ میکرولیتر dNTPs، ۱۰ میلی مولار، ۳ میکرولیتر MgCl₂، ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پرایمرهای F₁R، مقدار ۱ تا ۲۰ میکرولیتر DNA الگو (با توجه به غلظت DNA استخراج شده)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسد.

در این تحقیق از دستگاه ترموسیکلر Gradient mastercycler^۵ شرکت eppendorf استفاده شد. این دستگاه قابلیت های متعددی دارد، مزیت ویژه آن تکرارپذیری و سادگی برنامه ریزی آن است. همچنین این دستگاه قادر است ۹۶ لوله ۰/۲ میکرولیتری و ۷۷ لوله ۰/۵ میکرولیتری و یا مخلوطی از لوله های ۰/۲ و ۰/۵ میکرولیتری و یا یک پلیت ۹۶ خانه ای را در خود جای دهد.

چرخه های حرارتی مورد استفاده در این تحقیق ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۵۵ ثانیه و در سیکل نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود و سیکل حرارتی به تعداد ۳۳ مرتبه تکرار شد.

در مرحله نهایی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشگر ECOR1 بر روی محصول به دست آمده از واکنش PCR انجام گرفت و الگوی RFLP برای نمونه های مورد بررسی به دست آمد.

درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز نگهداری شد. به منظور تأمین رطوبت کافی و رشد بهتر، پلیت های کشت حاوی نمونه، درون کیسه های پلاستیکی قرار داده شد [۲].

پس از رشد و تشکیل کلنی، جداسازی و پاساژ مجدد کلنیها روی محیط MDA، انجام گرفت و از تست های تشخیصی برای شناسایی هر ایزوله استفاده شد. در واقع مهم ترین تست فیزیولوژیکی برای افتراق گونه های مالاسزیا، تست آسیمیلایون چربی یا جذب توئین های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ است. البته این تست در کنار سایر تست های افتراقی نظیر تست کاتالاز و رشد بر روی محیط سابورو دکستروز آگار برای شناسایی گونه های مالاسزیا استفاده شد. تمام مراحل جداسازی، کشت، بررسی مولکولی برای شناسایی ایزوله ها در بخش قارچ شناسی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

پس از ایزولایون و شناسایی گونه های مالاسزیا با استفاده از روش های متداول و رایج آزمایشگاهی، قسمتی از کلنی های هر یک از ایزوله ها، برای انجام مطالعات مولکولی PCR-RFLP استفاده شد. استفاده از روش های مولکولی شناسایی سریع و دقیق گونه های مختلف مالاسزیا را امکان پذیر می سازد. متأسفانه به دلیل کم بودن حجم نمونه، تنها ۳ گونه شایع مالاسزیا به دست آمد و از طریق تست های معمول بیوشیمیایی از یکدیگر تفکیک شدند. با روش مولکولی PCR-RFLP و تکثیر نواحی ژنومی^۱ مختلف نظیر β -tubulin, ITS, Lsu Rna می توان گونه های مختلف مالاسزیا را شناسایی کرد؛ ولی در این تحقیق برای افتراق ۳ گونه، به دست آمده بررسی ناحیه ژنومی ITS کفایت می کرد. ناحیه ژنومی ITS بین زیرواحد کوچک و بزرگ سیسترون^۲ RNA ریوزومی واقع شده است. این ناحیه در بین قارچ های مختلف و گونه های مخمری بسیار متنوع است. همچنان که بتازگی نشان داده شده است در واحدهای تکرار شونده در ژنهای rDNA در ITS اختلاف وجود دارد، بنابراین تکثیر PCR در این نواحی چندشکلی^۳ بالایی برخوردار بوده و قادر به تمایز میکروارگانیسم های متعلق به گروهها و سویه ها مختلف است [۱۰].

مراحل استخراج DNA، بررسی کمی و کیفی DNA، پروسه PCR و استفاده از آنزیم های محدود کننده اختصاصی (RFLP) به ترتیب در مراحل بعد بر روی نمونه ها انجام شد.

در این تحقیق از دو روش استخراج DNA استفاده شد. در روش پیشنهادی در کیت استخراجی Core biosystem میزان بازده DNA تخلیص شده کم بود؛ ولی در روش استخراجی که

1. Amplification
2. Cysterone
3. Polymorphism

4. Buffy coat
5. Thermocycler

۳- نتایج

در این تحقیق طی ۳ ماه نمونه‌گیری از بیماران مبتلا به تینه‌آ و رسیکالر، تعداد ۴۸ نمونه پوستی مثبت به‌دست آمد. از آنجا که بیماری تینه‌آ و رسیکالر مشکل حادی برای بیمار ایجاد نمی‌کند و تنها از جنبه زیبایی و ایجاد لکه‌های پوستی اهمیت دارد، تعداد مراجعه‌کنندگان به مراکز درمانی نسبت به تعداد حقیقی بیماران بسیار کم بود؛ از طرفی این بیماری شیوع فصلی دارد و در فصول گرم و مرطوب سال بیشتر مشاهده می‌شود. از این رو با توجه به موارد ذکر شده متأسفانه طی مدت ۳ ماه نمونه‌گیری، ۴۸ نمونه مثبت به‌دست آمد و به‌دلیل حجم کم نمونه، فقط ۳ گونه شایع مالاسزیا از نمونه‌ها جداسازی شد. که از این میان ۳۴ مورد مالاسزیا گلوبوزا، ۱۱ مورد مالاسزیا سیمپودیالیس و ۳ مورد مالاسزیا فورفور جداسازی شد.

مالاسزیا گلوبوزا با مصرف توئین‌های ۴۰ و ۶۰ و منظره میکروسکوپی (سلولهای کروی شکل) به‌راحتی قابل تشخیص بود. مالاسزیا فورفور با مصرف توئین‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ شناسایی شد و مالاسزیا سیمپودیالیس با مصرف توئین‌های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و عدم مصرف توئین ۲۰ مورد شناسایی قرار گرفت.

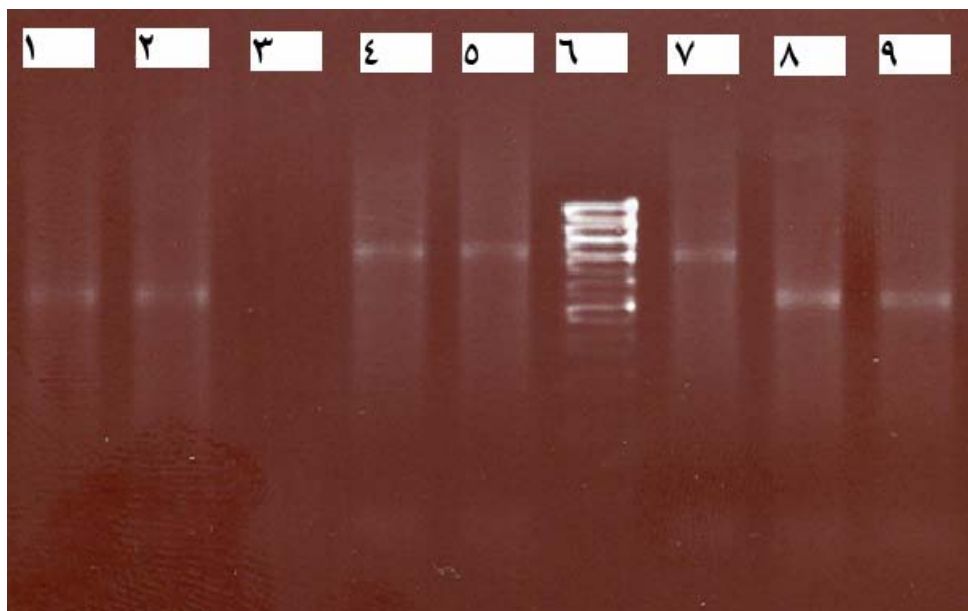
پس از استخراج موفق DNA، قطعه خاصی از DNA ژنومی با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای ITS1/4 تکثیر شدند.

سپس محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. قطعات تولیدی PCR در حدود ۶۰۰ bp تا ۸۰۰ bp طول داشتند و در شکل ۱ نشان داده شده است.

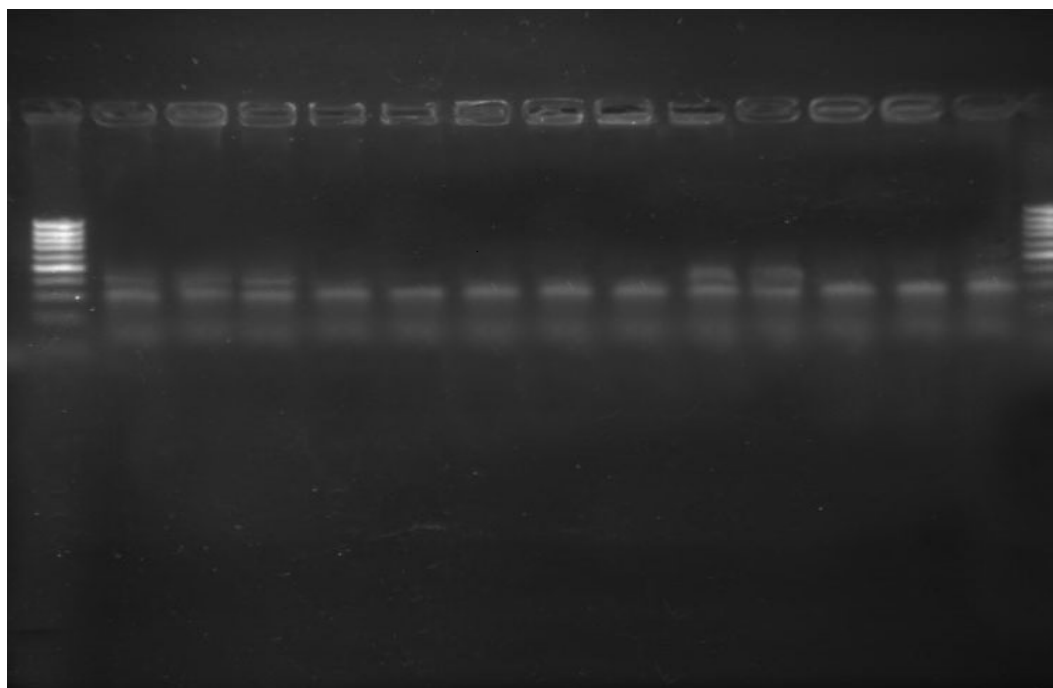
محصول PCR مالاسزیا سیمپودیالیس (۶۰۰ bp تا ۷۰۰ bp) کوچکتر از قطعات به‌دست آمده از PCR سایر گونه‌های مالاسزیا (در حدود ۸۰۰ bp) می‌باشد و از این رو به‌راحتی و تنها از روی باند مربوط به ITS1/4, PCR از سایر گونه‌های مالاسزیا قابل افتراق است. همان گونه که از شکل ۱ مشخص است، محصول PCR دو گونه مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا فورفور کاملاً مشابه بوده و افتراق این دو گونه بر اساس قطعات تولیدی ITS1/4, PCR تقریباً غیر ممکن است. برای شناسایی و افتراق دو گونه مزبور از الگوی RFLP با آنزیم ECOR1 استفاده شد.

الگوی RFLP مربوط به شکل ۲ با استفاده از آنزیم ECOR1 بر روی محصول ITS1/4, PCR به‌دست آمده است.

الگوی RFLP مالاسزیا سیمپودیالیس و مالاسزیا فورفور بسیار مشابه است و هر دو قطعات دو بانندی در حدود ۳۰۰ bp تا ۵۰۰ bp تولید می‌کنند؛ در حالی که مالاسزیا گلوبوزا قطعات تک بانندی در اندازه ۲۰۰ bp تا ۳۰۰ bp تولید می‌کند. بدین ترتیب مالاسزیا گلوبوزا را می‌توان از دو گونه دیگر افتراق داد (شکل ۲).



شکل ۱ ستون ۶ سایز مارکر ۱۰۰ bp است. ستونهای ۹، ۸، ۲، ۱ مربوط به مالاسزیا سیمپودیالیس می‌باشند. ستون ۳ به‌عنوان کنترل منفی به‌کار رفته است. ستونهای ۴ و ۵ نمونه مالاسزیا گلوبوزا هستند و ستون ۷ مالاسزیا فورفور است.



شکل ۲ ستونهای شماره ۱ و ۱۵ مربوط به سایز مارکر bp ۱۰۰ است. ستونهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ به الگوی RFLP مالاسزیا گلوبوزا مربوط است. ستونهای ۲ و ۳ به الگوی RFLP مالاسزیا سیمپودیالیس مربوط است. ستونهای ۱۰ و ۱۱ مربوط به مالاسزیا فورفور می باشد.

ترتیب در اکثر موارد به صورت مزمن مشاهده می شوند [۱]. امروزه شناسایی گونه های این ارگانیزم براساس تستهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام می گیرد، این تستها غالباً وقت گیر بوده و به نیروی متخصص نیاز دارند. از این رو در اکثر آزمایشگاههای تشخیص طبی، انجام نمی شوند و شناسایی مالاسزیا تنها در حد جنس صورت می گیرد. همچنین از آنجا که تمام گونه های جنس مالاسزیا نسبت به داروهای ضد قارچی حساسیت یکسانی ندارند و در اکثر موارد بیماری ناشی از این عوامل به طور کامل بهبود نمی یابد و موارد عود مکرر مشاهده می شود، برای درمان موفق، شناسایی عامل مولد بیماری تا حد گونه و انجام تستهای ارزیابی حساسیت دارویی بر روی آنها ضروری است [۱۱، ۱۲].

در این تحقیق با استفاده از روشهای متداول آزمایشگاهی گونه های شایع مالاسزیا در ایران، شناسایی شدند. در این خصوص ابتدا از خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در تشخیص گونه ها استفاده شد.

البته در اکثر مطالعات تمایز بین گونه ها با استفاده از خصوصیات فیزیولوژیکی و بدون اتکا بر خصوصیات مورفولوژیکی مطرح است.

نیازمندی چربی مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا ابتوزا و مالاسزیا

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، دو گونه مالاسزیا سیمپودیالیس و مالاسزیا فورفور در الگوی RFLP از یکدیگر قابل تفکیک نیستند؛ ولی در محصول PCR ITS1/4 مالاسزیا سیمپودیالیس به راحتی از سایر گونه ها قابل تشخیص است. بدین ترتیب سه گونه یاد شده به روش PCR-RFLP و تنها با استفاده از یک آنزیم برشگر ECOR1 از یکدیگر قابل تفکیک هستند.

۴- بحث

جنس مالاسزیا از نظر فیلوژنتیکی^۱ دارای نیای مشترک^۲ است و در کلاس اوستیلاجینومیست^۳ قرار می گیرد [۱]. مخمرهای چربی برای جنس مالاسزیا به عنوان فلور نرمال پوست جانوران خونگرم شناخته شده اند؛ ولی تحت شرایط خاصی می توانند بیماریهایی را در انسان و سایر جانوران ایجاد کنند. در میان عفونتهای قارچی جلدی، بیماریهای حاصله از مخمرهای مالاسزیا بخصوص بیماریهای تینه آورسیکالر و درماتیت سبوریه از جنبه زیبایی اهمیت ویژه ای دارند. عوامل مولد این بیماریها، با درگیری نواحی سطحی پوست، سیستم ایمنی میزبان را درگیر نمی کنند و بدین

1. Phylogenetically
2. Monophyletic
3. Ustilaginomycetes

همخوانی داشتند، ولی در یک مورد نتایج با یکدیگر مغایرت داشتند. در این مورد نمونه شماره ۴۲ در تستهای میکروسکوپی و فیزیولوژیکی به عنوان مالاسزیا فورفور شناسایی شده بود؛ ولی در تستهای مولکولی الگوی باندهای مالاسزیا سیمپودیالیس را نشان داد. مالاسزیا فورفور و مالاسزیا سیمپودیالیس از نظر فیزیولوژیکی بسیار شبیه به هم هستند و ابهامات ایجاد شده در مغایرت تستهای مولکولی و غیرمولکولی به میزان دقت و حساسیت تست توئین انجام شده، بستگی دارد.

بتازگی Mayer و همکارانش تستهای مکمل دیگری را پیشنهاد داده‌اند که با افزودن Cremophor EL به پلیت کشت و بررسی فعالیت بتاگلوکوزیداز می‌توان چنین ابهاماتی را برطرف کرد [۱۳].

در این تحقیق با آنالیز PCR-RFLP در ناحیه ITS اطلاعاتی به دست می‌آید که به اندازه کافی برای افتراق بین گونه‌های نزدیک که در تستهای فیزیولوژیکی ابهاماتی دارند، کفایت می‌کند. هرچند که تکنیکهای مولکولی عموماً قابل اعتماد است ولی توصیه می‌شود که در کنار این سیستم، آزمایشات میکروسکوپی و تستهای توئین و کاتالاز و ... نیز به منظور نتیجه‌گیری بهتر انجام گیرد.

اصلی‌ترین مرحله استخراج DNA تخریب دیواره سلولی مخمرهاست. از آنجا که جنس مالاسزیا دارای دیواره سلولی چند لایه‌ای است که به آن توانایی مقاومت بالا در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی را می‌دهد، شکستن و تخریب دیواره سلولی مخمر به سادگی امکان‌پذیر نیست. از این رو مرحله تخریب دیواره سلولی طی زمانهای انکوباسیون طولانی سلولهای مخمری در بافر لیزکننده، انجام می‌گردد. کشتهای کهنه که به صورت کلنیهای خشک در داخل ویال در ۲۰°C- نگهداری شده بودند نسبت به تخریب سلولی حساستر بودند.

رستریکتا بسیار حساستر از سایر گونه‌های جنس مالاسزیا می‌باشد؛ به طوری که تحت شرایط پایین چربی در محیط گلوکز پیتون آگار رشد نمی‌کند. برای رشد بهتر سه گونه یاد شده لازم است که از محیطهای پیچیده‌تر و مکملهای دیگری، نظیر نمکهای صغراوی نیز استفاده شود. در این تحقیق رشد مالاسزیا گلوبوزا در محیط تازه تهیه شده دیکسون اصلاح شده بخوبی انجام گرفت. در مقابل، گونه‌های مالاسزیا فورفور و مالاسزیا سیمپودیالیس در شرایط آزمایشگاهی راحت‌تر و بهتر قابل نگهداری هستند. بررسی شکل ظاهری کلنی‌های مالاسزیا روی محیط دیکسون اصلاح شده در تشخیص اولیه مالاسزیا و افتراق آن از مخمرهای دیگری نظیر کاندیدا می‌تواند راهگشا باشد.

تحقیق اخیر با هدف به‌کارگیری روشهای PCR-RFLP در شناسایی این گونه‌ها و بررسی سوش‌های شایع در ایران پایه‌ریزی شد. از میان ۴۸ نمونه مثبت به دست آمده از بیماران مبتلا به تینه آورسیکالر، حدود ۷۱ درصد مالاسزیا گلوبوزا و ۲۳ درصد مالاسزیا سیمپودیالیس و ۶ درصد مالاسزیا فورفور جداسازی شد. و این نشان می‌دهد که مانند اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی در دنیا، مالاسزیا گلوبوزا گونه غالب در بیماران می‌باشد.

توسعه روشهای مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی دوست مالاسزیا را فراهم نمود [۱۱، ۱۲]. با وجود این روشهای رایج و متداول قدیمی به عنوان خصوصیتی کلیدی در تشخیص اولیه گونه‌های مالاسزیا استفاده می‌شود. در این تحقیق سعی بر آن است تا نتایج به دست آمده از روش PCR-RFLP با نتایج تستهای متداول آزمایشگاهی مقایسه گردد که این روشها براساس کشت در محیط سابورو دکستروز آگار، تست کاتالاز، تست توئین و ... انجام می‌گیرد.

در اکثر موارد نتایج مولکولی و غیرمولکولی با یکدیگر

۵- منابع

- [1] Ajello, L., Hay, R.J. Diseases caused by *Malassezia* species. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology, New York, Axford university Press. 1998. 4: 201-211.
- [2] Gueho, E., Boekhout, T., Ashbee, H.R., Guillot, J., Vanbelkum, A. and Aergemann, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. Medical mycology. 1998. 36 (1): 220-229.
- [3] Marcon, M.J. and Powell, D.A. Human infections due to *Malassezia* Spp. Clin. Microbiological reviews. 1992. 5: 101-119.
- [4] Gueho, E., Midgley, G. and Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie Van Leeuwenhoek, 1996. 69: 337-355.

- [5] Guillot, J., Gueho, E., Lesourd, M., Midgley, G., Cheverier, G. and Dupont, B. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. *J. Mycol. Med.*, 1996. 103-110.
- [6] Midgley, G. The diversity of pityrosporum (*Malassezia*) yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia.*, 1989.106: 143-153.
- [7] Sugita, T., Takashima, M., Shinoda, T., Suto, H., Unno, T., Tsuboi, R., Ogawa, H. and Nishikawa, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, Isolated from patients with Atopic dermatitis. *J. Clin. Micro.*, 2002. 40(4): 1363-1367.
- [8] Takahashi, M., Ushijima, T. and Ozaki, y. Biological activity of pityrosporum. II, Antitumour and immune stimulating effect of Pityrosporum in mice. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 1986. 77: 1093-1097.
- [9] Nazzaro-Parro, M., Passi, S., Caprilli, F. and Morpurgo G. Growth requirements and lipid metabolism of pityrosporum orbiculare. *J. Invest. Dermatol.* 1976. 66: 178-182.
- [10] Turin, I., Riva, F., Galbiati, G. and Cainelli, T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Euro. J. Clin. Invest.*2000.30: 511-518.
- [11] Hummer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole and Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000. 44: 467-469.
- [12] Nakamura, Y., Kano, R., Murai, T., Watanabe, S. and Hasegawa, A. Susceptibility testing of *Malassezia* species using the urea broth microdilution method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000. 44: 2185-2186.
- [13] Mayser, P., Haze, P., Papavassilis, C., Pickel, M., Gruender, K. and Gueho, E. Differentiation of *Malassezia* species: Selectivity of cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br. J. Dermatol.* 1997. 137: 208-213.