تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

# شیوع گونه های مالاسزیا در بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک به روش PCR – Sequencing

**علی رائفی**
کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران

**آیت الله نصرالهی عمران**
دانشیار میکروبشناسی، گروه میکروبشناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران

**علی ناظمی**
استادیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

**نویسنده مسئول: علی رائفی**

**پست الکترونیک:** alito.raefi@yahoo.com
**تلفن :۰۹۱۱٦٦۳۷٥۳۲**
**آدرس:** دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، ایران

**دریافت: ۹۲/۱۰/۳۰**
**ویرایش پایانی: ۹۳/٤/۷**
**پذیرش: ۹۳/٤/۱۰**

## چکیده

***زمینه و هدف:*** *مالاسزیا مخمر چربی دوست است که جزء فلور نرمال پوست انسان و مهره داران خونگرم محسوب می شود. این قارچ به عنوان یکی از عوامل فرصت طلب بیماریزا در بیماری درماتیت سبورئیک است. در این تحقیق مخمر های جدا شده از نمونه های پوسته سر بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک به روش PCR-Sequencing تعیین هویت شدند.*

***روش بررسی:*** *در این مطالعه ۶۵ نمونه پوستی از پس گوش، اطراف بینی و شوره سر بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک جدا و برای جلوگیری از دهیدراتاسیون در محیط انتخابی سابورو آگار و دیکسون آگار تغییر یافته کشت داده شد. بعد از انجام آزمایش های بیوشیمیایی برای تعیین نوع گونه قارچی، با روش PCRاز پرایمرهای ITS1-4 Universal استفاده گردید. محصولات بدست آمده از PCR برای تعیین و تشخیص هویت گونه های مالاسزیا تعیین توالی شدند.*

***یافته ها:*** *برای ۹ نمونه قارچی بدست آمده از کشت پوسته سر بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک: ۴مورد مالاسزیا گلوبوزا، ۲مورد مالاسزیا رستریکتا، ۲ مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس،۱مورد کریپتوکوکوس آلبیدوس میلیس شناسائی شدند.*

***نتیجه گیری:*** *نتایج به دست آمده در این تحقیق شباهت زیادی را در فراوانی گونه های مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا رستریکتا با مطالعات دیگرنشان داد.*

***واژه های کلیدی:*** *مالاسزیا، تعیین توالی، درماتیت سبورئیک، تنکابن*

**آدرس مقاله**
رائفی ع، نصرالهی عمران آ، ناظمی ع " شیوع گونه های مالاسزیا در بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک به روش Sequencing – PCR" مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر۹۴، دوره نهم (شماره ۲): ۱-۷

## مقدمه

مالاسزیا ارگانیسم های چربی دوست اند، که به عنوان فلورنرمال پوست انسان و حیوانات خونگرم شناخته شده و همچنین به عنوان یکی از عوامل بیماری های پوستی به شمار می روند(۱). این جنس در شاخه بازیدیومایکوتا، رده هتروبازیدیومیست ها، راسته اوستیلاجینال ها وخانواده کریپتوکوکاسه طبقه بندی شده است. این مخمر دارای دیواره سلولی ضخیم و چند لایه با جوانه های متوالی از یک ناحیه سلول مادری است(۲). این گونه به طور گسترده در اجتماع وجود دارد که احتمال جایگزینی در دوران کودکی نیز است و بیشترین میزان تجمع بعد از بلوغ و بزرگسالی است. پژوهشگران بر روی پوست سر بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک و شوره سر تمرکز کرده اند و چندین منطقه با تمرکز بالای این مخمر در نواحی غنی از غده سباسه را یافتند.گونه های مالاسزیا در پوست افراد سالم تجمع پیدا می کنند و بیماری هایی مثل پیتیریازیس ورسی کالر،درماتیت سبورئیک،مالاسزیا فولیکولیت و آتوپیک درماتیتیس عود کننده را باعث می شود(۳). درماتیت سبورئیک بیماری پوسته ریزی است که پوست فرق سر، صورت و قفسه سینه را تحت تأثیر قرار می دهد که با پوسته پوسته های اریتروماتوز همراه است. بهترین راه شناسایی آن در پوست فرق سر است چین های نازولبیال دور بینی ابروها، پشت گوش ها و قفسه سینه در سراسر جناغ را درگیر می کند. مالاسزیا به عنوان یکی از عوامل موثر پوسته ریزی و به عبارتی شوره سر می باشد (۶). این بیماری در ۳ – ۱ درصد از جمعیت عمومی دیده شده است و شیوع بیشتری در مردان دارد. در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی مانند مبتلایان به AIDS نیز شیوع تا ۳۰– ۳۳ درصد نیز دیده شده است. شناسائی مستقیم میکروسکوپی عناصر قارچی از نمونه های بالینی یک روش شناسائی سریع، اما فاقد حساسیت و اختصاصیت می باشد. کشت مالاسزیا در آزمایشگاه یک آزمون شناسائی خاص ولی زمان بر می باشد و ممکن است رسیدن به نتایج تا ۳ هفته طول بکشد. لذا دسترسی به یک تکنیک آزمایشگاهی سریع و دقیق برای شناسائی گونه های مالاسزیا در سطح گونه و سویه بسیار دارای اهمیت است. امروزه روش های ملکولی مختلف برای تعیین گونه در مالاسزیا مورد توجه می باشد. این روش ها شاملPCR ژن خاص، آنالیزRFLP، تعیین توالی ژن زیر واحد بزرگrRNA، یا ژن کد کننده ی سنتز کیتین، انگشت نگاریPCR و هیبریداسیون DNA می باشد. تعیین توالی مناطق فضای داخلی رونویسی شده ثابت کرده که یک روش مفید برای شناسائی گونه های مالاسزیا است(۶). شناسائی گونه های مالاسزیا از نمونه های بیمارستانی با به کارگیری هدف هایی در نواحی IGSو ITS در تکنیک هایnested PCR و real-time PCR امکان پذیر است. آنالیز توالی IGS اگرچه برای تشخیص گونه های مالاسزیا به کار می رود ولی روش مناسبی برای تشخیص سویه ها نیست(۸). هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از مناطق $ITS_1$ و $ITS_4$ با استفاده از روش HRM-real time PCR و تعیین توالی محصولات real-time PCR برای شناسائی گونه های مالاسزیا است. هدف این تحقیق تعیین شیوع مالاسزیا در بیماران این منطقه به روش ملکولی بود.

## روش بررسی

نوع مطالعه توصیفی و نمونه گیری به روش غیر تصادفی آسان بود. هدف آن بررسی امکان استفاده از تعیین توالی مناطق ITS برای شناسایی گونه های مالاسزیا با استفاده از گونه های بالینی بود. تعداد ۶۵ نمونه بالینی از بیماران مشکوک به درماتیت سبورئیک و بیماران مبتلا به شوره سر مراجعه کننده به کلینیک های پوست شهرستان تنکابن از اسفند ۹۱ تا خرداد ۹۲ توسط اسکالپل کند استریل از ضایعات پوسته ریزی دهنده ابرو، اطراف بینی و پس گوش و شوره سر بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک جدا و در محیط میکوزیل آگار (سابورو دکستروزآگار حاوی روغن زیتون) و دیکسون آگار اصلاح شده به روش نشاءکاری کشت داده و در دمای ۳۰ – ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ هفته نگهداری شد(۹). در ابتدا نمونه های کشت داده شده در محیط کشت را با کمک شواهد ظاهری کلنی ها (شکل کلنی ، رنگ کلنی ،...) تشخیص داده و در مرحله بعد با کمک روش میکروسکوپی تایید تشخیص ظاهری انجام شد. مخمرهای جدا شده در کشت به وسیله آزمایش لوله زایا از گونه های کاندیدا موجود در پوست افتراق داده شدند. مخمرهای مالاسزیایی به وسیله

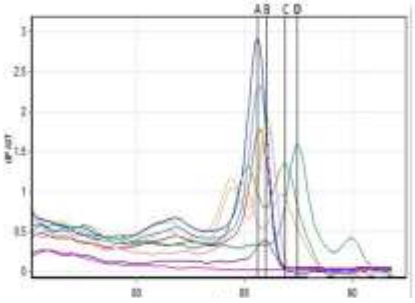
آزمایش های بیوشیمیایی مانند کاتالاز وB -گلوکوزیداز و به وسیله روش مولکولی real-time PCR تایید گردید(۷،۴).

استخراج DNA به صورت غیر مستقیم از نمونه های رشد یافته مالاسزیا در محیط کشت میکوزیل آگار و دیکسون اصلاح شده به روش فنل-کلروفرم صورت گرفت.µL۲۰۰ بافر TEبه نمونه ها اضافه و سپس ۵ بار در دمای ۵۰- درجه در فریزر و ۵ دقیقه در ۶۰ درجه ذوب گردید و سپس۴۰۰ Lµ تریتون ۱۰۰ x(%0/1) , 200µL پروتئیناز k به نمونه اضافه و۱۶ ساعت در ۶۵درجه انکوبه گردید.Lµ ۴۰۰فنل تعادلی و Lµ۴۰۰ کلروفرم به نمونه اضافه و در دور ۱۰۰۰۰سانتریفوژ و فاز روئی جدا شد. µL ۵۰۰کلروفرم به آن اضافه و ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و فاز رویی جدا و دو برابر فاز روئی به آن اتانول۹۶ درصد اضافه و۱۰ دقیقه در ۵۰- انکوبه و سپس در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب آن خشک و با ۳۰ µLبافر TE مخلوط گردید. به منظور شناسائی ملکولی گونه ها بر اساس تعیین توالی و همچنین گروه بندی آنها به دسته های کوچکتر برای تعیین توالی واکنش HRM real time PCR روی نمونه ها انجام شد(۱۰). حجم کلی واکنش ۵۰ میکرولیتر بوده و شامل بافر آنزیم X۱۰، ، 3mM $Mgcl_2$ ،0.2mM dNTP ،3U Taq polymerase ، 2 میکرولیتر پرایمر میکس $ITS_1$و $ITS_4$ pmol20 ، DNA 200ng ژنومی، 2mMرنگsyto-9 و ۲۳ میکرولیتر آب بود. سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل(۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه می باشدکه در این مرحله از پـــرایمرهای عـــمومی ITS1 و ITS4 بـــرای تـــکثیر قطعاتDNA اســـتفاده شد(۱۹،۱۱). فرایندHigh Resolution Melting Real Time PCR در دستگاه Corbett 6000 انجام شد.

## یافته ها

از بین ۶۵ بیمار ۲۰ زن و ۴۵ مرد و سه نفر از مردان مبتلا به دیابت بودند، در۲۰ نفر با توجه به علائم کلینیکی، آزمایش میکروسکوپی توسط آزمایشگاه قارچ شناسی نمونه مخمری تایید شدند. از این ۲۰ مورد، که حضور مخمر قارچی در نمونه پوسته آنها ثابت شد، ۲نفر زن(۱۰٪) و ۱۸ نفر مرد(۹۰٪) بودند، توزیع سنی افراد مورد مطالعه از ۱۳ تا ۴۵ سال با میانگین ۲۶ سال متغیر بود. از این تعداد ۹ نمونه که در کشت بدست آمده بود به وسیله آزمایش لوله زایا از گونه های کاندیدا موجود در پوست افتراق داده شد. به وسیله آزمایش های بیوشیمیایی مانند کاتالاز و B-گلوکوزیداز امتحان شدند، که ۴ مورد مالاسزیا گلوبوزا و ۲ مورد مالاسزیا رستریکتا بودند و این نتایج به وسیلهتعیین توالی DNA تایید گردیدند. آزمایش های بیوشیمیائی قادر به شناسائی ۳ نمونه دیگر نبود که پس از ارسال نمونه ها برای تعیین توالی جنس و گونه آنها مشخص گردید که دو نمونه آن مربوط به کریپتوکوکوس آلبیدوس و ۱ نمونه مربوط به گونه کریپتوکوکوس آلبیدوس میلیس بودند. این قارچ از رده بازیدیومیست است و از لحاظ شکل ظاهری و بعضی مشخصه های بیوشیمیایی شبیه مخمرهای مالاسزیا است که ممکن است در نتیجه تماس بیماران با خاک و یا کشاورزی کسب شده باشد.

نتیجه High Resolution Melting Real Time PCR: بر اساس HRM-Real time PCR و رسم نقطه ذوب در ۹ نمونه بخش مورد نظر تکثیر گردید. این ۹ نمونه بر اساس نقطه ذوب در ۴ گروه A,B,C,Dدسته بندی گردید.(شکل۱)




**شکل۱- نمودار افتراقی HRM گروه ها بر اساس نقطه ذوب ستون A مالاسزیا گلوبوزا ، ستون B مالاسزیا رستریکتا، ستون C کریپتوکوکوس آلبیدوس، ستون D کریپتوکوکوس آلبیدومیلیس**

پس از تایید صحتreal time PCR توسط الکتروفورز محصولات نهایی HRM-real time PCR هر ۴ نمونه منتخب برای تعیین توالی با پرایمر $ITS_1$ و $ITS_4$ به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج تعیین توالی، توالی هر نمونه بوسیله نرم افزار Chormas مشاهده و بررسی شد. با توجه به نتایج تعیین توالی و مقایسه آن با بانک ژنی NCBIگروه A که شامل چهار نمونه بود. به میزان ۹۸ درصد با توالی ژنی مالاسزیا گلوبوزا هماهنگ بود. گروه B که شامل دو نمونه بود به میزان ۹۸ درصد با توالی ژنی مالاسزیا رستریکتا هماهنگ بود. گروه C که شامل دونمونه بود به میزان ۱۰۰ درصد با توالی ژنی کریپتوکوکوس آلبیدوس هماهنگ بود. گروه D که شامل یک نمونه بود و به میزان ۱۰۰ درصد با توالی ژنی کریپتوکوکوس آلبیدومیلیس هماهنگ بود.

## بحث

مالاسزیا به عنوان یکی از رایج ترین عوامل عفونت های پوستی است که از دهه ۱۹۸۰ به عنوان عامل مسبب عفونت های سیستمیک فرصت طلب گزارش شده است. گستره ای از یک عفونت واقعی همانند پتریازیس ورسی کالر که به بافت حمله می کند یا در موارد نادر عفونت مالاسزیایی سیستمیک که مالاسزیا نقش عامل پاتوژنیک را بازی می کند(۱). به علت دیر رشد بودن مخمرهای مالاسزیا و خطرناک بودن مخمر های مالاسزیا در بیماران مبتلا به آتوپیک درماتیتیس و عفونت های سیستمیک، شناسائی سریع و دقیق جهت درمان سریع بیماران اهمیت دارد. شناسائی گونه های مالاسزیا از نمونه های بیمارستانی با به کارگیری هدف هایی در نواحیIGS و ITSدر تکنیک هایnested PCR و real-time PCRامکان پذیر است. آنالیز توالی IGS اگرچه برای تشخیص گونه های مالاسزیا به کار می رود ولی روش مناسبی برای تشخیص سویه ها نیست(۷). iYoung و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کره برای ارتباط برقرار نمودن بین آکنه و مخمرهای مالاسزیا تحقیق نمودند که در مطالعات قبلی این ارتباط مبهم دانسته شده بود. هر یک از سویه ها به روش 26srDNA PCR- RFLP شناسائی شدند. در این تحقیق به سن، جنس و وضعیت جسمانی بیماران نیز توجه شد. مشخص شد که گونه های مالاسزیا در این بیماران نسبت به افراد کنترل کمتر است(۱۲). که این روش محدودیت هایی را در شناسایی گونه های مالاسزیا نشان داده است که البته در روش بکار برده شده ما این مشکلات مرتفع شده است. خسروی و همکاران در سال ۲۰۰۹ به روی گسترش و اپیدمیولوژی گونه های مالاسزیا به روی پوست بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسی کالر تحقیق نمودند. این تحقیق بر طبق بکارگیری روش های بیوشیمیایی بود که ۲۵ نمونه پوستی از بیماران انتخاب و در محیط کشت سابورود آگار و دیکسون آگار تغییر یافته کشت داده شد. تشخیص و شناسائی گونه های مالاسزیا بر طبق آزمایش هایی مانند جذب توئین، واکنش کاتالاز، شکستن اسکوآلن و رشد بدون اضافه نمودن چربی بود. نتایج این تحقیق مالاسزیا گلوبوزا، مالاسزیا فورفور، مالاسزیا سیمپودیالیس، مالاسزیا پاکی درماتیس، مالاسزیا ابتوزا بود(۱۳). با توجه به وقت گیر بودن و دقت کم نسبت به روش های مولکولی، این روش مزیتی نسبت به روش بکار برده شده ما ندارد و شناسایی گونه ها با مشکل همراه است. شکوهی و همکاران برای تعیین گونه های مالاسزیا در بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک از PCR-RFLP استفاده کرد. ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی جهت تکثیر در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. آنگاه پلی مورفیسم موجود در قطعات تکثیر شده به روش RFLP با استفاده از آنزیم های CFO1 و BSTF51و ایجاد قطعات متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به الگوهای مختلفDNA های هضم شده گونه های مالاسزیا شناسائی شد. دراین مطالعه به ترتیب گونه های فورفور و گلوبوزا گونه های غالب بودند (۱۴). روش RFLP محدودیت هایی در شناسایی گونه ها دارد که این مشکل به روش PCR-Sequencingبکار برده شده مرتفع گردید. Jong و همکاران در کره مطالعه اپیدمیولوژیکی در رابطه با بررسی شیوع مالاسزیا در بیماران مبتلا به مالاسزیا فولیکولیت با استفاده از روش 26s rDNA PCR-RFLP را انجام دادند. در این مطالعه رابطه بین مکان های مختلف بدن، سن، جنس و ارتباط آن با مالاسزیا فولیکولیت مورد بررسی قرار گرفت. مالاسزیا رستریکتا در بیماران مبتلا به مالاسزیا فولیکولیت و گلوبوزا در نمونه های کنترل نمونه غالب بود. مالاسزیا

گلوبوزا گونه غالب ۱۳ مورد از قفسه سینه افراد بود و مالاسزیا رستریکتا رایج ترین گونه شناسائی شده در پیشانی و لب و گونه بود (۱۵).Byong و همکاران در کره در مطالعه ای مقایسه ای روش های PCR-RFLP و Nested-PCR را به کار بردند. به کارگیری PCR-RFLP 26 s rDNA به طور موفقیت آمیزی ۱۱ گونه از مخمرهای مالاسزیا را شناسائی نمود. با به کارگیری آنالیز Nested PCR هر ۱۱ گونه مالاسزیا نمونه های استاندارد شناسائی شدند. در مجموع ۶ نمونه مخمر مالاسزیا از ۳۲۷ نمونه مثبت که قبلاً با تکنیک PCR-RFLPشناسائی شده بودند تأیید گردید (۱۶).

Gaitanis و همکاران روی نمونه های پوستی بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک و بیماری های وابسته تحقیق نمود. DNA مالاسزیا از پوسته های بیماران با روش CTAB جدا وسپس با روش Nested-PCR تکثیر و از پرایمرهای عمومی قارچی $ITS_1/ITS_4$و $ITS_3/ITS_4$ برای تکثیر توالی های اصلی DNA ریبوزومی مالاسزیا استفاده شد که مشکل کمبود DNA با این روش مرتفع گردید. آنالیز RFLP محصولات PCR برای شناسائی زیر گونه های مالاسزیا به کار رفت. با استفاده از آنزیم های محدود کننده مانند Hinf1 و Alu1 گونه های مالاسزیافورفور، گلوبوزا، رستریکتا، سیمپودیالیس، پاکیدرماتیس، ابتوزا و اسلوفیه جدا گردید(۱۷). در طی دهه ی اخیر برای تشخیص مالاسزیا با استفاده ازPCR، ژن های هدف مختلفی به کار رفته است. در این مطالعه DNA هدف، قطع rDNA بود. از این قطعه ژنی، رونوشت های متعددی در ژنوم مالاسزیا وجود دارد. به طور معمول آزمایش PCR در صورتی که DNA هدف واجد توالی های تکرار شونده باشد نسبت به اهداف تک رونوشت، از حساسیت بیشتری برخوردار می باشد. از جمله مجموعه های فوق العاده حفاظت شده rDNA، قطعه ITS می باشد که در میان گونه های مختلف مالاسزیا دارای توالی های منحصر به فرد است. بنابراین با استفاده از پرایمرهای مرتبط به این نقاط، شناسائی گونه های مختلف مالاسزیا امکان پذیر شد(۱۸). اگرچه به تازگی چندین آزمون PCRبرای تکثیر rDNA گزارش شده، اما شناسائی گونه ها شامل انجام آزمون های بیشتر روی محصول تکثیر یافته است. از جمله این مراحل می توان به هضم آنزیمی محصول PCR به وسیله آنزیم های محدودالاثر، استفاده از پروب های نشان دار با مواد رادیو اکتیو و آنزیم های نشان دار و تعیین توالی محصول تکثیر شده را نام برد. بسیاری از این مراحل، پر هزینه، زمان بر و با توجه به بکارگیری مواد رادیواکتیو، خطرناک هستند. در مقابل روش PCR که در این مطالعه بکار گرفته شد به مدت زمان کمتری نیاز داشته و به پروب های هیبریدازاسیون و مواد رادیواکتیو احتیاج ندارد. استفاده از روش Real-time PCR که در هر زمان می توان هر گونه تغییر در مقدار محصول PCR را ردیابی کرد می تواند ناتوانی های روش ژل الکتروفورز در ردیابی مقادیر ناچیز DNA را جبران کند. از آنجائیکه در روش Real-time PCR به انجام مراحل بعد از فرایند تکثیر نیازی نیست، علاوه بر کاهش هزینه، انتقال آلودگی که منجر به پاسخ کاذب می شود، کمتر می شود. با استفاده از High Resolution Real Time PCR نمونه ها بر اساس نقطه ذوب گروه بندی می شوند و نیاز به تعیین توالی برای تمام نمونه ها از بین می رود. تنها یک نمونه منتخب از هر گروه تعیین توالی می گردد. که این روش باعث کاهش قابل ملاحظه ای در زمان و هزینه مطالعه می شود. مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا رستریکتا بیشترین میزان شیوع در مردان و زنان در تمام سنین را در بر می گیرند. در مردان مالاسزیا رستریکتا در تمام سنین و مخصوصاً بعد از سن ۱۶ سالگی غالب است. در زنان مالاسزیا گلوبوزا در سنین ۱۰ – ۱۸ سالگی غالب و مالاسزیا رستریکتا بعد از سن ۲۳ سالگی بر مالاسزیا گلوبوزا غلبه می یابد. در تحقیق ما مردان با سنین بین ۲۰-۳۰ سال بیشترین فراوانی را از نظر حضور دو جنس گلوبوزا و رستریکتا نشان دادند ولی در مورد بیماریزایی این گونه ها اطمینان وجود ندارد. به دلیل شرایط آب و هوایی و رطوبت شمال کشور و همچنین ارتباط با حیوانات شناسایی گونه های مالاسزیای منطقه و گسترش آن ها مهم است. هدف از این مطالعه تعیین شیوع گونه های مخمری مالاسزیا در نمونه های بالینی(پوست سر) و یا شوره سر بود. استفاده از HRM-Real Time PCR برای گروه بندی ایزوله های حاصل از تیمار میکروبیولوژیک، یکی از جنبه‌های نوآورانه تحقیق حاضر بود. کاهش قابل

توجه هزینه تحقیق و به دست آمدن سرعت عمل بسیار بالا از مزایای استفاده از این روش بودند.

## نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این تحقیق مشابهت فراوانی را در فراوانی گونه های مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا رستریکتا نشان داد و عدم یافتن بعضی از گونه های قارچی می تواند مربوط به جامعه آماری به نسبت پایین تر در مقایسه با دیگر تحقیقات و همچنین شرایط آب و هوایی منطقه شمال ایران باشد.


## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد. نویسندگان مراتب احترام و قدردانی خود را نسبت به کلیه اعضای هیات علمی گروه میکروب شناسی و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی و ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل همکاری‌های انجام یافته در رابطه با اجرای این تحقیق را اعلام می‌دارند


**References**


1. Zhang N, Suh So, BlackWell M. *Microorganism in the gut of beetles:evidence from molecular cloning*. J Invertebrpathol. 2003; 84(3): 223-226.

2. Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, et al. A *new yeasts, Malassezia yemamoentis, isolated from apatient with dermatit Seborrheic,and Its distribution in patients and healthy subjects*. Microbial Immunal. 2004; 48(8): 579-583.

3.Masuda A, sukegawa T, Mizumoto M, Tani H, Miyamoto T, Sasai K, et al. *Study of lipid in the ear canal in canine otitis external with malassezia pachydermatis*. J vet Med sci. 2000; 92: 1177-1182.

4. Gupta Ak, Kohli Y, Summerbell Rc, Faergemann J. *Quantitative culture of Malassezia species From different body sites of individuals with or without dermatoses*. MedMycol. 2001; 39(3): 243-251.

5. Saadatzade MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. *production of The mycelial phase of Malassezia in vitro*. Med Mycol. 2001; 39(6): 487-493.

6. Peterson SW, Kurtzman CP. *Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts system*. Appl microbial. 1991; 14(2): 124-129.

7. Salto-Telez M. *Multiplex RT-PCR for the Detection of leukemia-Associated Translations*. Journal of Molecular Diagnostic. 2003; 5(4): 231-236.

8. Pierard J, Dockx P. *The ultrastructure of Tinea versicolor and Malasseziafurfur*. Int J Dermatol. 1972; 11(2): 116-124.

9. Perrins N, Gaudiano F, Bond R. *Carriage of Malassezia spp. yeasts in cats with diabetes mellitus, hyperthgroidism and neoplasia* . Med Mycol. 2007; 45(6): 541-546.

10. Forghani F, Nazemi A, Oh DH, Saffar S, Taghinejhad K, Hamidkholgh KH. *Novel lactin Acid Bacteria in raw cows milk from highland farm.* Annals of Biological Research. 2012; 3(6): 3055-3061.

11. Thoma W, Kramer HJ, Mayser P. *Pityriasis versicolor alba*. JEADV. 2005; 19(2): 147-152.

12. Young CS, Hyung JH, Kim JY, Ko JH, Lee YW, Choe YB. *Epidemiologic Study of Malassezia Yeasts in Acne patients by Analysis of 26srDNA PCR-RFLp*. Ann Dermatol. 2011; 23(3): 321-328.

13. Khosravi AR. *Identification of Different Malassezia Species Isolated from patients with Malassezia Infections*. World Journal of Zoology. 2009; 4(2): 85-89.

14. Shokohi T, Hajheidari Z, Barzgar A, Hashemi Sooteh M, Hedayati M, Aghili S et al . *Identification of Malassezia Species isolated from patients with pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis by PCR-RFLP*. J Mazandaran Univ Med Sci. 2008; 18(66): 51-62.[Persian]

15. Song YC, Hahn YJ, Kim JY, Ko JH, Lee YW, Chohe YB, et al. *Epidemiologic Study of malassezia yeasts in patients with Mallasezia Folliculitis by 26srDNA PCR-RfLp Analysis*. Ann Dermatol. 2011; 23(3): 177-184.

16. Oh BH, Song YC, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. *Comparison of Nested PCR and RFLp for Identification and classification of Malassezia Yeasts from Healthy Humon skin*.AnnDermatol. 2009; 21(4): 352-3579.

17. Gaitanis G1, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A. *Identification of Malassezia species from patients skin scales by PCR-RFLP*. Clin Microbiol Infect. 2002; 8(3): 162-173.

18. Pinter L, Anthony RM, Glumac N, Hajsig D, Pogacnik M, Drobnic-Kosorok M. *Apporent cross-infection with asingle strain of Malassezia pachydermatis on a pig*. Acta vet Hang. 2002; 50(2): 151-159.

19. Guillot J, Gueho E. *The diversity of malassezia yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons*. Antonie van leeuwen hoek. 1995; 67(3): 297-314.

# Prevalence of Malassezia Species Isolated from the Skin of Patients with Seborrheic Dermatitis by PCR- Sequencing Method

**Raefi, A. (MSc)**
MSc of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

**Nasrollahi Omran, A. (PhD)**
Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

**Nazemi, A. (PhD)**
Assistant Professor of Genetic, Department of Genetic, Faculty of Biology Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

**Corresponding Author:** Raefi, A.

**Email:** alito.raefi@yahoo.com

**Received:** 20 Jan 2014
**Revised:** 28 Jun 2014
**Accepted:** 1 Jul 2014

## Abstract

**Background and Objective:** Malassezia yeast is considered lipophilic normal flora of human skin and warm-blooded vertebrates. This fungus is an opportunistic pathogen in causing seborrheic dermatitis. In this study, the yeasts isolated from the crust of the patients with seborrheic dermatitis were identified by PCR-Sequencing.

**Material and Methods:** In this study, 65 samples of the skin of ear, nose and dandruff were cultured in selective medium Sabouraud agar and modified Dixon agar to prevent dehydration. After biochemical tests, ITS1-4 Universal PCR primers were used to determine the species of yeast. Obtained PCR products were sequenced for the determination and identification of Malassezia species.

**Results:** Of nine samples obtained from scalp, four were Malassezia globosa, two Malassezia restricta, two Cryptococcus albidus and one Cryptococcus albidus milis.

**Conclusion:** The results of Malassezia globosa and Malassezia Restericta are very similar with those in studies elsewhere.

**Keywords:** Malassezia, Sequencing, Seborrheic Dermatitis, Tonekabon

This paper should be cited as: Raefi A, Nasrollahi Omran A, Nazemi A. [Prevalence of Malassezia Species Isolated from the Skin of Patients with Seborrheic Dermatitis by PCR- Sequencing Method]. mljgoums. 2015; 9(2): 1-7[Article in Persian]