

تعیین گونه عوامل مالاسزیائی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر با استفاده از روش PCR-restriction enzyme

دکتر سیدحسین میرهندی^۱، بیتا ترازویی^۲، دکتر کامیار زمردیان^۲، نیلوفر جلالی زند^۳

۱- استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران و آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی، مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان، ۲- دانشجوی Ph.D رشته قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳- کارشناس، آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی، مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان

زمینه و هدف: گونه‌های مالاسزیا بخشی از فلور طبیعی پوست انسان است. به علاوه این مخمرها در ایجاد بیماری‌های پوستی مختلفی هم چون درماتیت سبورئیک، درماتیت آتوپیک، شوره سر و پسوریازیس نیز نقش دارند. اخیراً محققان روش‌های مولکولی را برای تعیین گونه‌های مالاسزیا ارجح می‌دانند. در بررسی حاضر یک روش دقیق و ساده ژنوتیپی برای شناسایی و تعیین گونه عوامل مالاسزیایی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر در ایران به کار گرفته شده است. روش اجرا: در این مطالعه توصیفی ۸۳ ایزوله بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR-restriction enzyme صورت گرفت. یافته‌ها: *M. glubosa* شایع‌ترین گونه جدا شده از ضایعه‌های پیتیریازیس ورسیکالر بود و پس از آن سایر گونه‌ها به ترتیب شامل *M. furfur*، *M. sympodialis*، *M. restricta*، *M. slooffiae* بودند. هیچ موردی از *M. packydermatis* و *M. obtusa* مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نظر به این که در اغلب مطالعه‌های صورت گرفته، مالاسزیا سیمپودیالیس به عنوان گونه مالاسزیایی غالب در بین مالاسزیاهای فلور طبیعی پوست انسان بوده است، غلبه مالاسزیا گلوبوزا در ضایعه‌های بیماران پیتیریازیس ورسیکالر می‌تواند بر وجود خصلت‌های بیماری‌زا در این گونه دلالت داشته باشد. واژه‌های کلیدی: پیتیریازیس ورسیکالر، گونه‌های مالاسزیا، تشخیص مولکولی

فصلنامه بیماری‌های پوست ۱۳۸۵؛ دوره ۹ (۲): ۱۶۵-۱۷۲

وصول مقاله: ۸۴/۸/۱۴ پذیرش: ۸۴/۱۰/۶

ورسیکالر (Pityriasis Versicolor) هستند (۱-۳). هم

چنین شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد گونه‌های مالاسزیا در ایجاد بیماری‌های پوستی دیگر نظیر درماتیت سبورئیک، درماتیت آتوپیک، شوره سر و پسوریازیس نیز نقش دارند (۴-۶). در این بیماری، گاهی از ضایعه‌های

مقدمه

جنس مالاسزیا (*Malassezia*) شامل گروهی از قارچ‌های مخمری است که فلور طبیعی پوست انسان و حیوان‌های خون گرم است و معمولاً برای رشد، به چربی نیاز دارند. این مخمرها عامل بیماری شایع پوستی پیتیریازیس

مؤلف مسوول: دکتر سیدحسین میرهندی - تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه قارچ شناسی و

انگل شناسی پزشکی، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵

پست الکترونیک: mirhendi@sphtums.com

انواع و تعیین فراوانی هر یک از گونه‌های مالاسزیا، می‌تواند در زمینه اپیدمیولوژی و پاتوژنز بیماری پیتیریازیس ورسیکالر، که در ایران نیز بسیار شایع است، ره‌گشای تحقیق‌های آتی باشد.

روش اجرا

در این مطالعه توصیفی ۸۳ ایزوله بالینی از ضایعه‌های پوستی مبتلایان به پیتیریازیس ورسیکالر، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از سطح ضایعه‌ها به کمک چسب اسکاچ صورت گرفت. نمونه‌های حاصل در محیط دیکسون تغییر یافته (Modified Dixon medium) کشت داده و به مدت ۲ هفته در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ایزوله‌های به دست آمده بعد از خالص سازی و کشت انبوه در محیط فوق‌الذکر، تا زمان آزمایش‌های تکمیلی در محلول گلیسرول ۳۰ درصد در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد.

DNA کروموزومی قارچ‌های جدا شده مطابق با روش قبلاً توصیف شده، استخراج شد (۲۰). به طور خلاصه یک لوپ پر از سلول مخمری (حدود ۱۰-۵ میلی‌متر مکعب) به تیوب‌های اپندرف منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (TritonX1002%، EDTA 1mM، Tris10Mm، NaCl، 100mM)، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط مساوی فنل - کلروفرم و حدود ۲۵۰ میکرولیتر از دانه‌های شیشه‌ای (glass-bead) به قطر ۰/۵ میلی‌متر به آن افزوده و پس از حدود ۵ دقیقه تکان شدید در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. پس از استخراج مجدد با کلروفرم، به مایع رویی ۳۰۰ میکرولیتر ایزو- پروپانول اضافه و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در منفی ۲۰ درجه در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله با الکل ۷۰ درجه شسته شد. رسوب نهایی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل یا بافر TE (EDTA 1mM، Tris 10M) در ۲۰ درجه سانتی‌گراد

مبتلایان، عوامل مالاسزیایی جدا می‌شود و از سوی دیگر در بسیاری موارد بیماری‌های مزبور با تجویز داروهای ضد قارچی، رو به بهبود می‌روند. ضمن این که هم زمان با بهبودی، جمعیت مخمرهای مالاسزیا کاهش و جمعیت آن‌ها با عود بیماری، مجدداً افزایش می‌یابد (۱ و ۲).

اخیراً این مخمرها به عنوان عوامل پاتوژن فرصت طلب، در ایجاد بیماری‌های مهاجم کشنده‌ای هم چون سپتی سمی و پریتونیت به خصوص در نوزادان نارس و افراد بالغ دچار ضعف سیستم دفاعی، مطرح شده‌اند (۱۰-۷).

مطابق با طبقه‌بندی جدید که بر اساس توالی نوکلئوتیدهای DNA ریوزومی صورت گرفته است، مالاسزیایاها به هفت گونه شامل *M. furfur*، *M. obtusa*، *M. slooffiae*، *M. restricta*، *M. globosa*، *M. packydermatis*، *M. sympodialis* تقسیم شده‌اند (۱۲ و ۱۱). در سال‌های اخیر گونه‌های جدیدتری نیز به این هفت گونه اضافه شده و در حال حاضر این جنس شامل ۱۲ گونه است (۱۶-۱۳).

برای تعیین گونه‌های مالاسزیا ویژگی‌های فیزیولوژیک، نظیر الگوی مصرف توین‌های مختلف، واکنش کاتالاز، هیدرولیز صفرا و نیز بررسی مورفولوژی ماکروسکوپی به کار گرفته شده است (۱۷ و ۱۲). اما با توجه به مورفولوژی نسبتاً مشابه و دشوار بودن جداسازی و نگهداری بعضی گونه‌ها مانند رستریکتا و گلوبوزا، و نیز تشابه و ابهام نتایج فیزیولوژیک در برخی گونه‌ها مانند فورفور، سمپودیالیس و اسلوفیه، روش‌های فتوتیپیک فوق‌الذکر، برای شناسایی گونه‌ها مناسب نیست، و لذا اخیراً محققان، روش‌های مولکولی را برای این منظور، ارجح می‌دانند (۱۹ و ۱۸ و ۲ و ۱). ما قبلاً یک روش دقیق و ساده ژنوتیپی را برای شناسایی ۱۱ گونه شناخته شده مالاسزیا معرفی کرده‌ایم (۲۰). در بررسی حاضر نیز برای تعیین گونه عوامل مالاسزیایی جدا شده از بیماران مبتلا به پیتیریازیس ورسیکالر در ایران روش مزبور به کار گرفته شده است. نتایج حاصل از این پژوهش در شناسایی و بررسی مولکولی

نگهداری شد.

محصول‌های PCR با ۲/۵ میکرولیتر بافر ویژه آنزیم و ۱/۵ میکرولیتر آب مقطر در تیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری مخلوط و به مدت ۲ ساعت در حرارت 37°C قرار داده شد.

محصول‌های PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ (۱/۵ گرم آگارز در ۱۰۰cc بافر) و محصول‌های RFLP روی ژل ۱/۸٪ با استفاده از اختلاف پتانسیل ۱۰ ولت به ازای هر سانتی متر طول ژل، الکتروفورز شد. آن گاه ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه uvidoc با طول موج ۶۱۲ نانومتر مشاهده و به طریق دیجیتال عکس برداری شد.

یافته‌ها

پس از بررسی نرم‌افزاری، توالی نوکلئوتیدهای قطعه 28SrDNA متعلق به گونه‌های مالاسزیا مشاهده شد، این قطعات در گونه‌های مالاسزیا از حیث نوع و تعداد نوکلئوتید اختلاف‌های اندکی داشتند. از روی این اختلاف‌ها آنزیم محدودالایر CfoI به عنوان به‌ترین آنزیم برای افتراق این گونه‌ها از طریق PCR-RFLP انتخاب شد.

۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده به مخلوط PCR شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر رفت (TAACAAGGATTCCCCTAGTA) ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت (ATTACGCCAGCATCCTAAG) ۰/۵ میکرولیتر DNTP و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase اضافه و حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر مدل Applied Biosystems طبق برنامه زیر طی ۳۰ سیکل صورت پذیرفت:

Primary Denaturation: 94°C ، ۵ دقیقه،

Denaturation: 94°C ، ۴۵ ثانیه،

Annealing: 55°C ، ۱ دقیقه،

Extension: 72°C ، ۴۵ ثانیه،

Final extension: 72°C ، ۷ دقیقه،

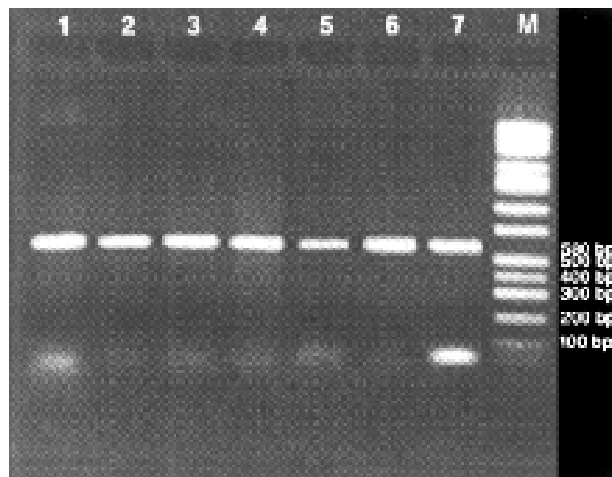
مطابق روش قبلاً توصیف شده (۲۰)، محصول‌های PCR توسط آنزیم CfoI بریده شد تا با استفاده از الگوهای مختلف متعلق به گونه‌های متفاوت مالاسزیا نوع آن‌ها تشخیص داده شود. به طور خلاصه ۲ میکرولیتر از

جدول شماره ۱ - اندازه محصول‌ها PCR مربوط به گونه‌های مختلف مالاسزیا قبل و بعد از برش با آنزیم CfoI

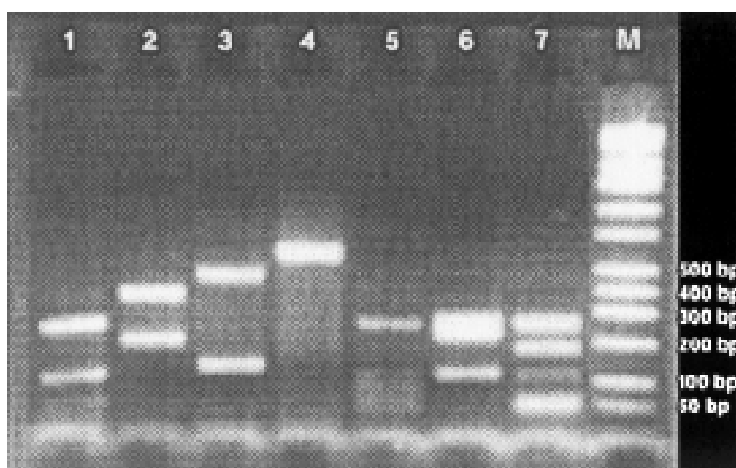
| اندازه محصول RFLP | نواحی برش توسط CfoI | اندازه محصول PCR | گونه |
|------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| ۱۰۷,۲۵۰,۲۲۳ | ۱۰۷,۳۵۷ | ۵۸۰ | M.pachydermatis |
| ۳۵۷,۲۱,۲۰۰ | ۳۵۷,۳۷۸ | ۵۷۸ | M.sympodialis |
| ۴۵۵,۱۲۹ | ۴۵۵ | ۵۸۴ | M.globosa |
| ۱۰۷,۲۵۰,۱۸,۱۵۳,۲,۲۹,۲۱ | ۱۰۷,۳۵۷,۳۷۸,۵۲۸,۵۳۰,۵۵۹ | ۵۸۰ | M.obtusa |
| ۱۰۷,۲۵۰,۸۷,۶۴,۷۶ | ۱۰۷,۳۵۷,۴۴۴,۵۰۸ | ۵۸۴ | M.sloofiae |
| ۱۰۷,۲۵۰,۱۱۳,۵۹,۲,۳۰,۲۱ | ۱۰۷,۳۵۷,۴۷۰,۵۲۹,۵۳۱,۵۶۱ | ۵۸۲ | M.furfur |
| ۵۸۱ | - | ۵۸۱ | M.restricta |

(تصویر شماره ۳) مبتلا به پیتیریازیس وریکال در زیر نشان داده شده است. محصول‌های PCR برای همه‌ی گونه‌ها تقریباً یکسان بوده اما پس از هضم اندونوکلازای آن‌ها با آنزیم CfoI، پروفیل متفاوتی به دست آمد.

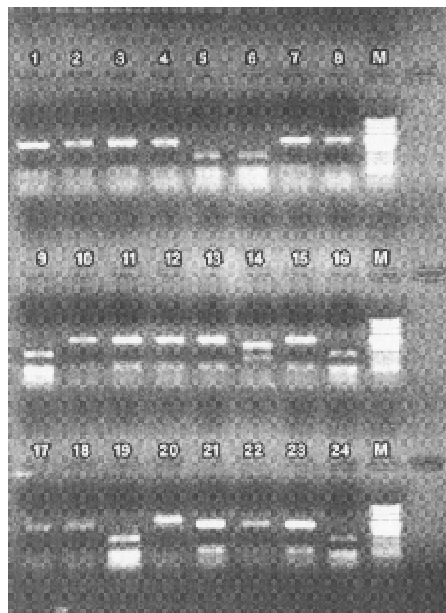
نتیجه الکتروفورز محصول‌های حاصل از PCR هر کدام از گونه‌های استاندارد مالاسزیا (تصویر شماره ۱)، الکتروفورز محصول‌های حاصل از RFLP هر کدام از گونه‌ها (تصویر شماره ۲) و بالاخره الکتروفورز PCR-RFLP برخی از نمونه‌های مالاسزیا جداشده از بیماران



تصویر شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تقویت قطعه 28SrDNA متعلق به ۷ گونه مالاسزیا
1-M.furfur, 2-M.sympodialis, 3-M.globosa, 4-M.restricta, 5-M.slooffiae, 6-M.pachydermatis,
7- M.obtusa, 8-Molecular marker 100bp ladder



تصویر شماره ۲- الکتروفورز محصول‌های PCR-RFLP پس از برش با آنزیم CfoI مربوط به ۷ گونه مالاسزیا، نمونه‌های ۱ تا ۷ به ترتیب: M.furfur, M.sympodialis, M.globosa, M.restricta, M. slooffiae, M. pachydermatis, M.obtuse
، نمونه M مارکر مولکولی (Ladder 100 bp)



تصویر شماره ۳- نتایج الکتروفورز محصول های PCR-RFLP مربوط به برخی مالاسزیاهای جدا شده از بیماران. نمونه های ۱-۴، ۷، ۸، ۱۰-۱۳، ۱۵، ۲۰-۲۳ نشانگر مالاسزیا گلوبوزا. نمونه های ۲۴، ۱۹، ۱۶، ۹، ۶، ۵ حاکی از مالاسزیای فورفور و نمونه ۱۴ مربوط به مالاسزیای سیمپودیالیس است. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی است.

تا چند سال اخیر برای مالاسزیاهای عامل پیتیریازیس ورسیکالر، تنها دو گونه در نظر گرفته می شد. یک گونه وابسته به چربی به نام *M.furfur*. یک گونه چربی دوست (اما نه وابسته به چربی) موسوم به *M.pachydermatis*، جنس مزبور در حال حاضر با تغییر ملاک های طبقه بندی مرفولوژیک و فیزیولوژیک به معیارهای ژنتیکی و مولکولی شامل ۷ گونه است و ۵ گونه ی پیشنهاد شده دیگر برای مالاسزیای مطرح است (۱۸-۱۶ و ۱۳ و ۱۲). معیار طبقه بندی جدید بر اساس نوع و تعداد نوکلئیدهای موجود در قطعه سنگین DNA مسوول کد کردن RNA ریبوزومی یا 28S rDNA است. خاصیت قطعه مزبور این است که در بین اعضای وابسته به جنس، محافظت

با توجه به الگوهای RFLP حاصل از گونه های استاندارد مالاسزیای که دقیقاً با جدول داده های کامپیوتری مربوط (جدول شماره ۱) تطبیق دارد، هویت ایزوله های بالینی تعیین شد.

گونه های جدا شده شامل *M.globosa* ۵۳ مورد (۶۳/۸٪)، *M.furfur* ۲۴ مورد (۲۸/۹٪)، *M.sympodialis* ۳ مورد (۳/۶٪)، *M.restricta* ۲ مورد (۲/۴٪) و *M.sloffiae* یک مورد (۱/۲٪) بود. هیچ موردی از *M.obtusa* و *M.pachydermatis* مشاهده نشد.

بحث

گرفت تا حدود زیادی با نتایج حاصل از روش مولکولی حاضر تطابق دارد.

نظر به این که در اغلب مطالعه‌های صورت گرفته، در بین مالاسزیاهای فلور طبیعی پوست انسان گونه *M. sympodialis* به عنوان گونه مالاسزیایی غالب بوده است (۲۲-۲۴)، غلبه مالاسزیا گلوبوزا در ضایعه‌های بیماران پیتیریازیس و رسیکالر می‌تواند بر وجود خصلت‌های بیماری‌زایی در این گونه، دلالت داشته باشد. به این طریق نتایج بررسی حاضر قادر است در درک پاتوژنیسیته بیماری پیتیریازیس و رسیکالر که بیماری شایعی - به خصوص در جوانان - است کمک کننده باشد. تا آنجا که ما اطلاع داریم این بررسی از جمله محدودیت‌های مطالعه‌های صورت پذیرفته در رابطه با شناسایی عوامل پیتیریازیس و رسیکالر با استفاده از روش‌های مولکولی در جهان و اولین تحقیق از این دست در ایران است. بررسی عوامل مالاسزیایی موجود در ضایعه‌های پسوریازیس با همین روش هدف مطالعه‌های بعدی است که امید می‌رود نتایج آن به زودی منتشر شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش طی طرح مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به اجرا درآمد که بدین وسیله از تمامی مسوولان و کارکنان آن معاونت و نیز همه اعضای شوراهای پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه، دانشکده بهداشت و گروه انگل شناسی و قارچ شناسی کمال تشکر را داریم. از کمک‌های آقایان و خانم‌ها دکتر پریش کردبچه، دکتر سیدجمال هاشمی، خوشقدم امید، لیلا حسین پور و محسن نوروزی نیز صمیمانه متشکریم.

شده (Conserved) بوده و لذا برای انتخاب پرایمرهای عمومی جنس در آن محل‌های مناسبی وجود دارد. در این مطالعه با در نظر گرفتن نقاط مزبور که بین تمام گونه‌های بررسی شده مالاسزیا مشترک هستند، پرایمرهای مناسبی انتخاب و استفاده شد که با موفقیت توأم بود و واکنش PCR، به تقویت قطعه مزبور در تمام گونه‌های مالاسزیا منجر شد. از طرف دیگر این ناحیه ژنومی دارای نقاط کوچکی محتوی نوکلئوتیدهای متغیر (variable) در بین مالاسزیاهای مختلف بود و لذا برای انتخاب آنزیم یا آنزیم‌های restriction به منظور برش آن نواحی و ایجاد الگوی RFLP مناسب برای افتراق مالاسزیاهای نقاط مناسبی است. در این تحقیق با توجه به بررسی‌های قبلی (۲۰) آنزیم *CfoI* برای شناسایی ایزوله‌های مالاسزیایی جدا شده انتخاب شد.

این آنزیم هفت گونه پذیرفته شده مالاسزیا را از یکدیگر افتراق داد و تنها تمایز *M. furfur* و *M. sloffiea* تا حدودی مشکل است. با افزایش غلظت آگارز در هنگام الکتروفورز، مشکل مزبور قابل حل است. به نظر می‌رسد که این سیستم PCR-RFLP راهی ساده و کم‌هزینه، سریع و درعین حال معتبر و دقیق برای شناسایی مخمرهای مالاسزیا است.

از بین ۸۳ مالاسزیای جدا شده از بیماران که با این روش شناسایی شدند، بیش‌ترین فراوانی متعلق به *M. globosa* (۶۳/۸۵٪) بود. نتایج مطالعه ترازویی و همکاران وی (۲۱) در رابطه با شناسایی گونه‌های مالاسزیای عامل پیتیریازیس و رسیکالر در ایران که با استفاده از روش‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک صورت

References

- 1-Midgley G. The lipophilic yeasts state of the art and prospects. *Med Mycol* 2000; 38: 9-16.

- 2-Midgley G, Gueho E, Guillot J. Diseases caused by *Malassezia* species, In: Ajello L, Hay RJ, editors. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold; 1998: 201-11.
- 3-Benham RW. The cultural characteristics of *Pityrosporum ovale*-a lipophilic fungus. *J Invest Dermatol* 1939; 2: 187-203.
- 4-Ashbee HR, Evans EG. Immunology of diseases associated with *Malassezia* 2-species. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 21-57.
- 5-Bergbrant IM, Faergemann J. Seborrhoeic dermatitis and *Pityrosporum ovale*: a cultural and immunological study. *Acta Dermatol Venereol* 1989; 69: 332-35.
- 6-Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 133-42.
- 7-Bell LM, Alpert G, Slight PH, et al. *Malassezia furfur* skin colonization in infancy. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988; 9: 151-53.
- 8-Powell DA, Hayes J, Durrell DE, et al. *Malassezia furfur* skin colonisation of infants hospitalised in intensive care units. *J Pediatr* 1987; 111: 217-20.
- 9-Schleman KA, Tullis G, Blum R. Intracardiac mass complicating *Malassezia furfur* fungemia. *Chest* 2000; 118: 1828-29.
- 10-Gueho E, Boekhout T, Ashbee HR, et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol* 1998; 36: 220-29.
- 11-Gueho E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-55.
- 12-Guillot J, Gueho E. The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie Leeuwenhoek* 1995; 67: 297-314.
- 13-Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. New yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 579-83.
- 14-Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1363-67.
- 15-Sugita T, Takashima M, Kodama RM, et al. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4695-99.
- 16-Hirai A, Kano R, Makimura K, et al. *Malassezia nana* sp. Nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 623-27.
- 17-Guillot J, Gueho E, Lesourd M, et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med* 1996; 6: 103-10.
- 18-Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1869-75.

- 19-Makimura K, Tamura Y, Kudo M, et al. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 2000; 49: 29-35.
- 20-Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-84.
- 21-Tarazooie B, Kordbacheh P, Zaini F, et al. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. *BMC Dermatol* 2004; 4: 5.
- 22-Crespo Erchiga V, Ojeda Martos A, Vera Casario A, et al. Mycology of pityriasis vesicolor. *J Mycol Med* 1999; 9: 143-48.
- 23-Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, et al. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol* 2001; 39: 243-51.
- 24-Arzumanian VG. The yeast *Malassezia* on the skin of healthy individuals and patients with atopic dermatitis. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2001; 2: 29-31. Russian.