جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دورهٔ ۹ ، شمارهٔ ۱: از ۳۷ تا ۴۳
بهار ۱۳۸۵

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 بازیدیومیکوتاها و خانوادهٔ 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 ورسیکالر، درماتیت سبوره،... 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 حدود۶۰۰bp تا ۸۰۰bp طول داشتند. محصول PCR *مالاسزیا سیمپودیالیس* (bp ۶۰۰ تا bp ۷۰۰) کوچکتر از محصول PCR سایر گونه‌های مالاسزیا بود و از این رو به‌راحتی 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 ITS1/4 PCR 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 فرصت‌طلب جنس مالاسزیا متعلق به شاخه بازیدیومیکوتاها[۱]، رده هتروبازیدیومیست‌ها[۲]، راسته اوستیلاجینالها[۳]، خانوادهٔ 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: ۰۲۴۱-۴۲۱۳۴۶۵
E-mail: ama.myco@yahoo.com

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

این مخمرها تحت شرایط خاصی قادر به ایجاد بیماری نظیر تینه آ ورسیکالر[۱]، درماتیت سبوره[۲]، و ... می‌باشند و بتازگی به‌عنوان پاتوژنهای فرصت‌طلب، عامل عفونتهای مهاجم تشخص داده شده‌اند[۱، ٦].

گونه‌های مالاسزیا تمایل زیادی به چربی به‌عنوان سوبسترا دارند، لذا از این ویژگی برای شناسایی آنها استفاده می‌شود. وجود دیوارهٔ سلولی چند لایه، توانایی تجزیه اوره، واکنش مثبت به‌دنبال رنگ‌آمیزی با رنگ دی‌آزونیوم بلو B[۳] 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*[٤]، *مالاسزیا پاکی درماتیس*[٥] و *مالاسزیا سیمپودیالیس*[٦] 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 گونهٔ دیگر به نامهای *مالاسزیا گلوبوزا*[۷]، *مالاسزیا ابتوزا*[۸]، *مالاسزیا اسلوفیه*[۹]، و *مالاسزیا رستریکتا*[۱۰] به‌وسیلهٔ گیهو[۱۱]، میدجلی[۱۲] و گیلوت[۱۳] تا سال ۱۹۹٦ تعیین شده است [۱]. در سالهای اخیر نیز در پی استفاده از روشهای PCR-RFLP[۱٤] و ... دو گونهٔ *مالاسزیا درماتیس*[۱٥] و *مالاسزیا ژاپونیکا*[۱٦] 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 ایزوله‌ها ارزشمند است. اما در عفونتهای سیستمیک شناسایی و بازیافت مخمرها در تشخیص صحیح و سریع ضروری به نظر می‌رسد [۱].

به منظور کشت ارگانیسم 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 ۱۹۷٦ برای اولین بار معمول شد. افزودن توئین‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ در محیط خود تأییدی بر تفاوت تغذیه‌ای بین گونه‌های مختلف مالاسزیاست [٥، ۹].

۲- مواد و روشها

در این تحقیق نمونه‌های بالینی از مراجعه‌کنندگان به درمانگاههای پوست بیمارستان رازی تهران و درمانگاه دانشگاه تربیت مدرس که دارای علایم بالینی بیماریهای تینه‌آوریسکالر و درماتیت سبوره بودند و بیماری آنها به‌وسیلهٔ متخصصان پوست تأیید شده، در طی مدت ۳ ماه جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری به روش تراشیدن پوسته‌ها، انجام گرفت. در این روش پس از مشخص‌کردن 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 تهیهٔ 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 ۳/٦ گرم، پپتن ۰/٦ گرم، صفرای گاو ۲ گرم، توئین ٤۰ 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 به‌وسیلهٔ آنس استریل بر روی محیط MDA تازه تهیه شده به‌صورت نشاکاری در چند نقطه تلقیح و در دمای ۳۲

1. Tinea Versicolor
2. Seborrheic dermatitis
3. Diazonium blue B
4. *M.furfur*
5. *M.pachydermatis*
6. *M.sympodialis*
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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

درجه سانتیگراد به‌مدت ۷ روز نگهداری شد. به منظور تأمین رطوبت کافی و رشد بهتر، پلیت‌های کشت حاوی نمونه، درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد [۲].

پس از رشد و تشکیل کلنی، جداسازی و پاساژ مجدد کلنیها روی محیط MDA ، انجام گرفت و از تستهای تشخیصی برای شناسایی هر ایزوله استفاده شد. در واقع مهمترین تست فیزیولوژیکی برای افتراق گونه‌های مالاسزیا، تست آسیمیلاسیون چربی یا جذب توئین‌های ۸۰،۶۰،۴۰،۲۰ است. البته این تست در کنار سایر تستهای افتراقی نظیر تست کاتالاز و رشد بر روی محیط سابورو دکستروز آگار برای شناسایی گونه‌های *مالاسزیا* استفاده شد. تمام مراحل جداسازی، کشت، بررسی مولکولی برای شناسایی ایزوله‌ها در بخش قارچ‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

پس از ایزولاسیون و شناسایی گونه‌های مالاسزیا با استفاده از روشهای متداول و رایج آزمایشگاهی، قسمتی از کلنی‌های هر یک از ایزوله‌ها، برای انجام مطالعات مولکولی PCR-RFLP استفاده شد. استفاده از روشهای مولکولی شناسایی سریع و دقیق گونه‌های مختلف مالاسزیا را امکان‌پذیر می‌سازد. متأسفانه به‌دلیل کم بودن حجم نمونه، تنها ۳ گونه شایع مالاسزیا به‌دست آمد و از طریق تستهای معمول بیوشیمیایی از یکدیگر تفکیک شدند. با روش مولکولی PCR-RFLP و تکثیر نواحی ژنومی[1] مختلف نظیر β-tubulin, ITS, Lsu Rrna می‌توان گونه‌های مختلف مالاسزیا را شناسایی کرد؛ ولی در این تحقیق برای افتراق ۳ گونه، به‌دست آمده بررسی ناحیه ژنومی ITS کفایت می‌کرد. ناحیهٔ ژنومی ITS بین زیرواحد کوچک و بزرگ سیسترون[2] RNA ریبوزومی‌واقع شده است.این ناحیه در بین قارچهای مختلف و گونه‌های مخمری بسیار متنوع است. همچنانکه بتازگی نشان داده شده است در واحدهای تکرارشونده در ژنهای rDNA در ITS اختلاف وجود دارد، بنابراین تکثیر PCR در این نواحی چندشکلی[3] بالایی برخوردار بوده و قادر به تمایز میکروارگانیسمهای متعلق به گروهها و سویه‌ها مختلف است[۱۰].

مراحل استخراج DNA، بررسی کمی‌و کیفی DNA، پروسهٔ PCR و استفاده از آنزیمهای محدود کنندهٔ اختصاصی (RFLP) به‌ترتیب در مراحل بعد بر روی نمونه‌ها 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 با استفاده از Chelex انجام گرفت. هرچند میزان DNA استخراجی بالا بود؛ اما میزان ناخالصی پروتئینی و پلی‌ساکارید نیز بسیار بالا بود. از طرفی DNA استخراج شده به میزان زیادی خرد شده و قطعات کوچک DNA به‌صورت اسمیر در ژل الکتروفورز مشاهده می‌شد. از این رو روش ارائه شده در کیت استخراجی Core biosystem با ظرافت و دقت بیشتری برای کسب مقادیر بالای DNA انجام گرفت و مرحلهٔ 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 نمونه‌های خون، لنفوسیتهای بافی کت[4]، سلولهای کشت شده، بافت و سلولهای باکتریال به‌کار می‌رود. 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 به‌دست 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. به‌طور 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 $MgCl_2$ ، ۵۰ میلی مولار، ۵ میکرولیتر پرایمرهای F,R، مقدار ۱ تا ۲۰ میکرولیتر DNA الگو (با توجه به غلظتDNA استخراج شده)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می‌رسد.

در این تحقیق از دستگاه ترموسیکلر Gradient mastercycler[5] شرکت eppendorf استفاده شد. این دستگاه قابلیتهای متعددی دارد، مزیت ویژه آن تکرارپذیری و سادگی برنامه‌ریزی آن است. همچنین این دستگاه قادر است ۹۶ لوله ۰/۲ میکرولیتری و ۷۷ لوله ۰/۵ میکرولیتری و یا مخلوطی از لوله‌های ۰/۲ و ۰/۵ میکرولیتری و یا یک پلیت ۹۶ خانه‌ای را در خود جای دهد.

چرخه‌های حرارتی مورد استفاده در این تحقیق ۹۴°C به‌مدت ۴ دقیقه، ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۵۸°C به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۵۵ ثانیه و در سیکل نهایی ۷۲°C به‌مدت 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 به‌دست آمده از واکنش PCR انجام گرفت و الگوی RFLP برای نمونه‌های مورد بررسی به‌دست آمد.

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 ورسیکالر[1]، تعداد ٤٨ نمونه پوستی مثبت به‌دست آمد. از آنجا که بیماری *تینهآ ورسیکالر* 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، ٤٨ نمونه مثبت به‌دست آمد و به‌دلیل حجم کم نمونه، فقط ۳ گونهٔ شایع مالاسزیا از نمونه‌ها جداسازی شد. که از این میان ٣٤ مورد *مالاسزیا گلوبوزا*، ۱۱ مورد *مالاسزیا سیمپودیالیس* و ۳ مورد *مالاسزیا فورفور* جداسازی شد.

مالاسزیا گلوبوزا با مصرف توئین‌های ٤٠ و ٦٠ و منظره میکروسکوپی (سلولهای کروی شکل) به‌راحتی قابل تشخیص بود. مالاسزیا فورفور با مصرف توئین‌های ٨٠،٦٠،٤٠،٢٠ شناسایی شد و مالاسزیا سیمپودیالیس با مصرف توئین‌های ٤٠، ٦٠، ٨٠ و عدم مصرف توئین ۲۰ مورد شناسایی قرار گرفت.

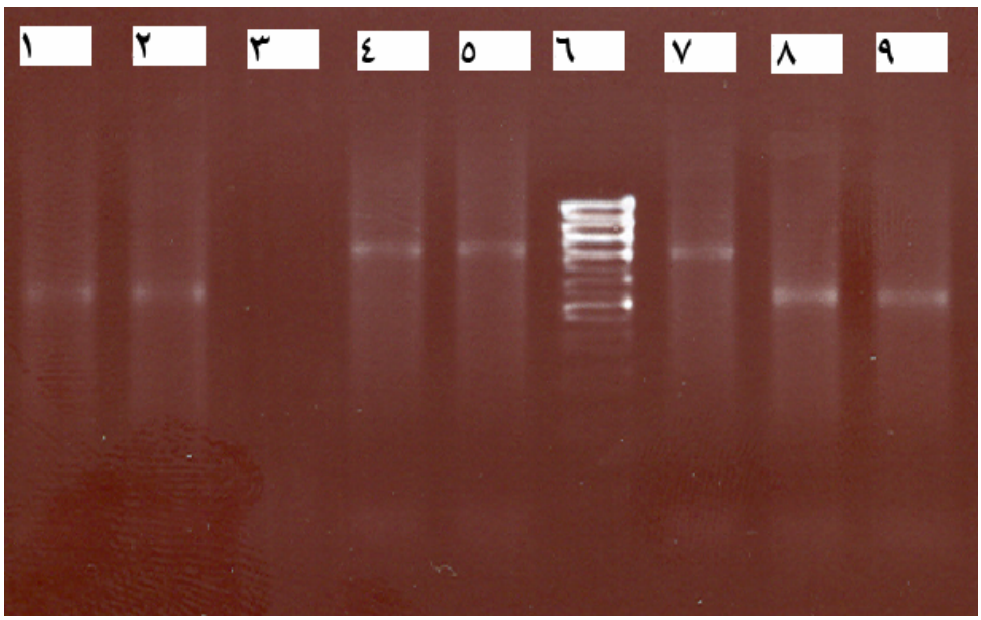
پس از استخراج موفق DNA، قطعه خاصی از DNA ژنومی با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای ITS١/٤ تکثیر شدند. سپس محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. قطعات تولیدی PCR در حدود ٦٠٠bp تا ٨٠٠bp طول داشتند و در شکل ۱ نشان داده شده است.

محصول PCR *مالاسزیا سیمپودیالیس*(٦٠٠ bp تا ٧٠٠ bp) کوچکتر از قطعات به‌دست آمده از PCR سایر گونه‌های مالاسزیا (در حدود ٨٠٠ bp) می‌باشد و از این رو به‌راحتی و تنها از روی باند مربوط به ITS١/٤, 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 تولیدیITS١/٤, PCR تقریباً غیر ممکن است. برای شناسایی و افتراق دو گونه مزبور از الگوی RFLP با آنزیم ECOR١ استفاده شد.

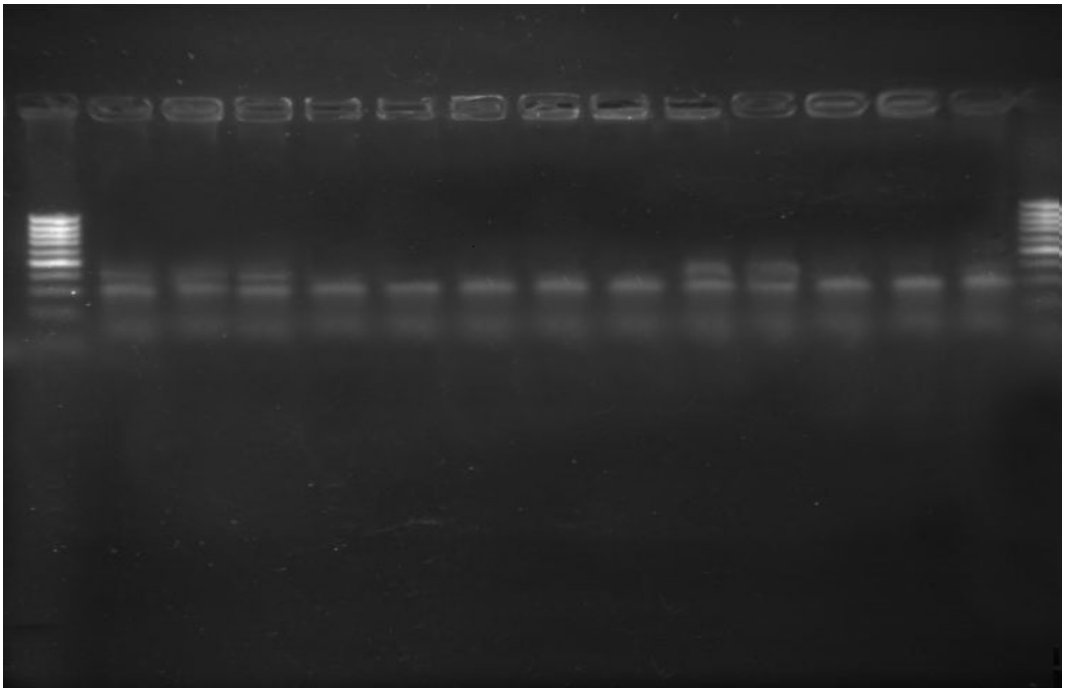
الگوی RFLP مربوط به شکل ۲ با استفاده از آنزیم ECOR1 بر روی محصول ITS١/٤, PCR به‌دست آمده است.

الگوی RFLP مالاسزیا سیمپودیالس و *مالاسزیا فورفور* بسیار مشابه است و هر دو قطعات دو باندی در حدود ۳۰۰ bp تا ٥٠٠ bp تولید می‌کنند؛ در حالی‌که *مالاسزیاگلوبوزا* قطعات تک باندی در اندازه ۲۰۰ bp تا ۳۰۰ bp تولید می‌کند. بدین ترتیب *مالاسزیا گلوبوزا* را می‌توان از دو گونه دیگر افتراق داد (شکل۲).



شکل ۱ ستون ٦ سایز مارکر ١٠٠ bp است. ستونهای ۹، ۸ ، ۲، ۱مربوط به مالاسزیا سیمپودیالیس می‌باشند. ستون ۳ به‌عنوان کنترل منفی به‌کار رفته است. ستونهای ٤ و٥ نمونه مالاسزیا گلوبوزا هستند و ستون ۷ مالاسزیا فورفور است.

1. Tinea versicolor



شکل ۲ ستونهای شمارهٔ ۱و۱۵ مربوط به سایز مارکر bp ۱۰۰ است. ستونهای ۵ ،٦ ،۷ ،۸، ۹ ،۱۲،۱۳و۱٤ به الگوی RFLP *مالاسزیا گلوبوزا* مربوط است. ستونهای ۲، ۳و٤ به الگوی RFLP *مالاسزیا سیمپودیالیس* مربوط است. ستونهای ۱۰ و ۱۱ مربوط بـه *مالاسـزیا فورفـور* می‌باشد.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، دو گونـه *مالاسـزیا سیمپودیالیس* و *مالاسزیا فورفـور* در الگـوی RFLP از یکـدیگر قابل تفکیک نیـستند؛ ولـی در محـصولPCR ITS۱/٤ *مالاسـزیا سیمپودیالیس* به‌راحتی از سایر گونـه‌هـا قابـل تـشخیص اسـت. بدین‌ترتیب سه گونه یاد شده به روش PCR-RFLP و تنها با استفاده از یک آنزیم برشگر ECOR۱ از یکدیگر قابل تفکیک هستند.

٤- بحث

جنس *مالاسزیا* از نظر فیلوژنتیکی[1] دارای نیای مـشترک[2] اسـت و در کلاس اوستیلاجینومیست[3] قرار می‌گیرد.[۱]. مخمرهای چربی برای جنس *مالاسزیا* به‌عنوان فلور نرمال پوست جانوران خونگرم شناخته شده‌اند؛ ولی تحت شرایط خاصی می‌توانند بیماریهایی را در انسان و سایر جانوران ایجاد کنند. در میان عفونتهای قـارچی جلـدی، بیماریهـای حاصـله از مخمرهـای *مالاسـزیا* بخـصوص بیماریهای تینـه آورسـیکالر و درماتیـت سـبوره از جنبـهٔ زیبـایی اهمیت ویژه‌ای دارند. عوامل مولد این بیماریها، با درگیری نواحی سطحی پوست، سیستم ایمنی میزبان را درگیر نمی‌کننـد و بـدین ترتیب در اکثر موارد به صورت مزمن مشاهده می‌شوند[۱].

امروزه شناسایی گونه‌های ایـن ارگانیـسم براسـاس تـستهای فیزیولوژیکی و بیوشـیمیایی انجـام مـی‌گیـرد، ایـن تـستها غالبـاً وقت‌گیر بوده و به نیروی متخصص نیاز دارند. از این رو در اکثر آزمایشگاههای تـشخیص طبـی، انجـام نمـی‌شـوند و شناسـایی *مالاسزیا* تنها در حد جنس صورت می‌گیرد. همچنین از آنجا کـه تمام گونه‌های جنس *مالاسزیا* نسبت بـه داروهـای ضـد قـارچی حساسیت یکسانی ندارند و در اکثر موارد بیماری ناشـی از ایـن عوامل به‌طور کامل بهبود نمی‌یابد و مـوارد عـود مکـرر مـشاهده می‌شود، برای درمان موفق، شناسایی عامل مولد بیمـاری تـا حـد گونه و انجام تستهای ارزیابی حـساسیت دارویـی بـر روی آنهـا ضروری است [۱۲،۱۱].

در این تحقیق با استفاده از روشـهای متـداول آزمایـشگاهی گونـه‌هـای شـایع *مالاسـزیا* در ایـران، شناسـایی شـدند. در ایـن خصوص ابتدا از خصوصیات مورفولـوژیکی و فیزیولـوژیکی در تشخیص گونه‌ها استفاده شد.

البتـه در اکثـر مطالعـات تمـایز بـین گونـه‌هـا بـا اسـتفاده از خـصوصیات فیزیولـوژیکی و بـدون اتکـا بـر خـصوصیات مورفولوژیکی مطرح است.

نیازمندی چربی *مالاسزیا گلوبوزا*، *مالاسزیا ابتوزا* و *مالاسـزیا*

1. Phylogenetically
2. Monophyletic
3. Ustilaginomycetes

رستریکتا بسیار حساستر از سایر گونه‌های جنس *مالاسزیا* می‌باشد؛ به‌طوری‌که تحت شرایط پایین چربی در محیط گلوکز پپتون آگار رشد نمی‌کنند. برای رشد بهتر سه گونهٔ یاد شده لازم است که از محیطهای پیچیده‌تر و مکملهای دیگری، نظیر نمکهای صفراوی نیز استفاده شود. در این تحقیق رشد *مالاسزیا گلوبوزا* در محیط تازه تهیهٔ 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 اولیهٔ *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 ٤٨ نمونهٔ مثبت به‌دست آمده از بیماران مبتلا به تینه آورسیکالر، حدود ٧١ درصد *مالاسزیا گلوبوزا* و ٢٣ درصد *مالاسزیا سیمپودیالیس* و ٦ درصد *مالاسزیا فورفور* جداسازی شد. و این نشان می‌دهد که مانند اکثر مطالعات اپیدمیولوژیکی در دنیا، *مالاسزیا گلوبوزا* گونهٔ غالب در بیماران می‌باشد.

توسعهٔ روشهای مولکولی پایه و اساس طبقه‌بندی جدید مخمرهای چربی دوست *مالاسزیا* را فراهم نمود [١٢،١١]. با وجود این روشهای رایج و متداول قدیمی به‌عنوان خصوصیتی کلیدی در تشخیص اولیهٔ گونه‌های *مالاسزیا* استفاده می‌شود. در این تحقیق سعی بر آن است تا نتایج به‌دست 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 همخوانی داشتند، ولی در یک مورد نتایج با یکدیگر مغایرت داشتند. در این مورد نمونهٔ شماره ٤٢ در تستهای میکروسکوپی و فیزیولوژیکی به‌عنوان *مالاسزیا فورفور* شناسایی شده بود؛ ولی در تستهای مولکولی الگوی باندی *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 Mayser و همکارانش تستهای مکمل دیگری را پیشنهاد داده‌اند که با افزودنCremophor EL به پلیت کشت و بررسی فعالیت بتاگلوکوزیداز می‌توان چنین ابهاماتی را برطرف کرد [١٣].

در این تحقیق با آنالیز PCR-RFLP در ناحیه ITS اطلاعاتی به‌دست می‌آید که به اندازهٔ 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 مرحلهٔ استخراج DNA تخریب دیوارهٔ سلولی مخمرهاست. از آنجا که جنس *مالاسزیا* دارای دیوارهٔ سلولی چند لایه‌ای است که به آن توانایی مقاومت بالا در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی را می‌دهد، شکستن و تخریب دیوارهٔ سلولی مخمر به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. از این رو مرحلهٔ تخریب دیوارهٔ سلولی طی زمانهای انکوباسیون طولانی سلولهای مخمری در بافر لیزکننده، انجام می‌گرفت. کشتهای کهنه که به‌صورت کلنیهای خشک در داخل ویال در ٢٠°C- نگهداری شده بودند نسبت به تخریب سلولی حساستر بودند.

٥- 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 Leewenhoaek, 1996. 69: 337-355.

[5] Guillot, J., Gueho, E., Lesourd, M., Midgley, G., Cheverier, G. and Dupont, B. Identification of Malassezia species: a practical approch. J. Mycol. Med., 1996. 103-110.

[6] Midgley, G. The diversity of pityrosporum (Malassezia) yeasts invivo and invitro. 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, l., 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 againt 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.