Journal of Military Medicine
Winter 2017,Volume 18, Issue 4
Pages: 344-352

Molecular Identification of Malassezia Species Using PCR-Sequencing Method in Military Forces on Islands of Abu-Musa, Great Tonb and Sirri, Persian Gulf, 2011

Mohammad Ali Afshari [1], Reza Kachuei [2]*, Hossein Jafari [3], Mahdi Zareei [4], Jafar Anisi [5], Majid Riazipour [6], Mohsen Nosrat Abadi [7]

[1] *Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2]*Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[3]*Marine Medicine Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[4]*Department of Health, Rescue and Treatment of IR Iran Police Force, Tehran, Iran.*
[5]*Behavioral sciences Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[6]*Department of Parasitology and Mycology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[7]*Department of Medical Mycology and Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received: 8 August 2015 **Accepted**: 14 February 2017

Abstract

Background and Aim: The knowledge and recognition of fungal diseases in each area is extremely important. The aim of this study was the survey and molecular identification of Malassezia species which were isolated from pityrosporosis and tinea versicolor diseases in military forces on three Iranian islands of Abu-Musa, Great Tonb and Sirri's by PCR-sequencing method.

Methods: This cross-sectional study was performed during October - September 2011 in Abu-Musa, Great Tonb and Sirri's islands (Persian Gulf) on military individuals. The samples taken from patients with suspected fungal lesions were studied by mycological (direct, culture) and molecular methods (PCR-sequencing).

Results: In this study, 102 military forces with the mean age of 26 years within the range of 19-53 years old were studied. Among them, 17 patients (16.7 %) were infected with fungal diseases of pityrosporosis (dandruff) (58.8 %), tinea versicolor (35.3 %) and dermatophytosis (5.9 %) respectively. The most frequent species of Malassezia isolated from dandruff and tinea versicolor were *M. restricta* (80%) and *M. globosa* (67%), respectively.

Conclusion: In this study, the most frequent Malassezia species isolated from dandruff and tinea versicolor were *M. restricta* and *M. globosa*, respectively. In this study, the manual method of DNA extraction from direct sample scrapings was used which has been rarely reported in Iran.

Keywords: Persian Gulf, Military Forces, Malassezia Species, PCR, Iran

*Corresponding author: **Reza Kachuei**, Email: kachueiz@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵
صفحات: ۳۵۲-۳٤٤

شناسایی مولکولی گونه های مالاسزیا به روش PCR-sequencing در نیروهای نظامی جزائر ابوموسی، تنب بزرگ و سیری، خلیج فارس، ۹۱-۱۳۹۰

محمد علی افشاری[۱]، رضا کچوئی*[۲]، حسین جعفری[۳]، مهدی زارعی[٤]، جعفر انیسی[٥]، مجید ریاضی پور[٦]، محسن نصرت آبادی[۷]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
[۳] دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات طب دریا دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
[۴] استادیار، معاونت بهداشت، امداد و درمان نیروی انتظامی جمهوری اسلامی ایران(ناجا)، تهران، ایران
[۵] مربی، مرکز تحقیقات علوم رفتاری دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
[۶] استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
[۷] دانش آموخته گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: آگاهی از بیماری های قارچی و تعیین هویت قارچ های عامل، در هر منطقه ضروری است، این مطالعه با هدف بررسی و شناسایی مولکولی گونه های مالاسزیای عامل تینه آ ورسیکالر و پیتیروسپوروزیس در نیروهای نظامی جزائر ابوموسی، تنب بزرگ و سیری صورت گرفت.

روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی از مهر سال ۱۳۹۰ تا شهریور سال ۱۳۹۱ در سه جزیره ابوموسی، تنب بزرگ و سیری (خلیج فارس) بر افراد نظامی انجام شد، پس از تکمیل پرسشنامه از افراد دارای ضایعات مشکوک قارچی (۴۲/۱٪)، نمونه گیری صورت گرفت، نمونه های تهیه شده به دو روش قارچ شناسی (آزمایش مستقیم و کشت) و مولکولی (PCR-sequencing) آزمایش شدند.

یافته‌ها: در این بررسی تعداد ۱۰۲ نفر نظامی با میانگین سنی ۲۶ سال و با دامنه سنی ۵۳-۱۹سال، مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۷نفر (۱۶/۷ ٪) به بیماری های قارچی مبتلا بودند که شامل پیتروسپوروزیس (شوره سر) (۵۸/۸ ٪)، تینه آ ورسیکالر (۳۵/۳ ٪) و درماتوفیتوزیس (۵/۹ ٪) می باشد. گونه غالب عامل شوره سر و تینه آ ورسیکالر به ترتیب *مالاسزیا رستریکتا* (۸۰٪) و *مالاسزیا گلوبوزا* (۶۷٪) بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه شایعترین گونه مالاسزیای عامل بیماری پیتروسپوروزیس و تینه آ ورسیکالر به ترتیب *مالاسزیا رستریکتا* و *مالاسزیا گلوبوزا* بود که مطابق با مطالعات انجام شده در ایران و جهان است. در این بررسی، به روش دستی از نمونه مستقیم تراشه بیمار DNA مالاسزیاها استخراج گردید که در ایران به ندرت گزارش شده است.

کلیدواژه‌ها: خلیج فارس، نیروهای نظامی، مالاسزیا، PCR، ایران

*نویسنده مسئول: رضا کچوئی. پست الکترونیک: kachueiz@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۲۶

مقدمه

عفونت های حاصل از قارچ ها دارای طیف وسیعی بوده و به اشکال بیماری های قارچی سطحی، جلدی، مخاطی، زیرجلدی و احشایی طبقه بندی می شوند (۱). از شایع ترین بیماری های قارچی سطحی می توان بیماری پیتریازیس ورسیکالر (Pityriasis versicolor) و پیتروسپوروزیس (Pityrosporosis) یا شوره سر را نام برد، بیماری پیتریازیس ورسیکالر یک عفونت مزمن قارچی لایه شاخی پوست است که به وسیله مخمر های لیپوفیلیک جنس مالاسزیا (Malassezia) ایجاد می شود، این مخمر بخشی از فلور نرمال پوست می باشد و قبلا به عنوان پیتروسپوروم (Pityrosporom) نامیده می شد (۲).

بیماری بیشتر در بزرگسالان یا جوانان شایع است، ارگانیسم، آزلائیک اسید (Azelaic acid) تولید می کند که این ماده انتقال پیگمان به کراتینوسیت ها را مهار می کند (۲)، به دنبال آن لکه های قهوه ای روشن یا سفید بر روی پوست ایجاد می شود این لکه ها بر روی شانه ها، بازو ها، گردن، سینه، پشت، شکم و به ندرت در نواحی دیگر ظاهر می شوند. لکه ها بر روی پوست تیره، به رنگ صورتی یا سفید و در پوست روشن به رنگ قهوه ای روشن مشاهده می شوند (۲).

بیماری دارای انتشار جهانی است و در نواحی گرمسیری شیوع بیشتری دارد، در ایران پیتریازیس ورسیکالر، در مناطق گرم و مرطوب جنوبی شیوع فراوان دارد (۳). استرس، عفونت های مزمن، فقر بهداشتی، عرق فراوان، سوء تغذیه، زمینه ژنتیکی، استفاده طولانی مدت از آنتی بیوتیک ها ی وسیع الطیف، پوشش های تنگ نایلونی و استفاده از استرویید ها از جمله عوامل مستعد کننده ابتلا به این بیماری است، همچنین چرب بودن پوست و رطوبت نیز در بروز بیماری می تواند دخالت داشته باشد (۵-۳).

دیگر بیماری های مرتبط با مخمر های مالاسزیا شامل دندروف (شوره سر)، درماتیک سبورئیک (Seborrheic dermatitis)، درماتیت آتوپیک (Atopic dermatitis)، فولیکولیت (Folliculitis) و به ندرت اونیکومایکوزیس (Onychomycosis) و بلفاریت (Belpharitis) می باشد (۶، ۷).

گونه مالاسزیا فورفور (*M.furfur*) سال ها به عنوان تنها عامل بیماری شناخته می شد (۲)، بعد از آن گونه های *مالا سزیا پاکی در ماتیس (M.pachydermatis) و مالاسزیا سیمپودیالیس (M.sympodialis)* معرفی شد. پس از آن بررسی های چند سال اخیر نشان می دهد که حدود ۱۴ گونه مالاسزیا عامل بیماری می باشند، دیگر گونه های این جنس شامل *مالاسزیا گلوبوزا (M.globosa)، مالاسزیا رستریکتا (M.restricta)، مالاسزیا ابتوزا (M.obtusa)، مالا سزیا / سلوفیه (M.slooffiae)، مالا سزیا ژاپونیکوم (M.japonicum)، مالا سزیا درماتیس (M.dermatis)، مالاسزیا نانا (M. nana)، مالاسزیا یاماتوئنسیس (M. yamatoensis)، مالاسزیا کونیکولی (M. cuniculi)، مالاسزیا اکوئینا (M. equina) و مالا سزیا کاپرا (M. caprae)* می با شند، اخیرا گونه جدید *مالاسزیا آرونالوکئی (M. arunalokei)* نیز از هند گزارش شده است (۱۱-۸).

در خصوص شناسایی گونه های مالاسزیا به روش های مولکولی مطالعات متعددی در خارج انجام شده است (۱۵-۱۲)، در ایران نیز مطالعاتی توسط میرهندی و همکاران، محمودی راد و همکاران و دیده دار و همکاران صورت گرفته است و روش شناسایی آن ها PCR-RFLP بوده است (۱۹-۱۶)، بر اساس اطلاعات ما گزارشی مبنی بر تعیین توالی آنها در ایران ارائه نشده است. در مطالعات قبلی در نیروها و پرسنل نظامی در ایران عوامل ایجاد کننده دو بیماری پیتریازیس ورسیکالر و پیتروسپوروزیس در حد تشخیص بیماری و معرفی جنس مالاسزیا بوده است (۲۲-۲۰) و تاکنون شناسایی گونه های مالاسزیای عامل بیماری در این دسته افراد به روش مولکولی گزارش نشده است.

بررسی حاضر با هدف بررسی و شناسایی مولکولی گونه های مالاسزیای عامل پیتریازیس ورسیکالر و پیتیروسپوروزیس در نیروهای نظامی جزائر ابوموسی، تنب بزرگ و سیری برای اولین بار انجام گرفت.

روش‌ها

جمعیت مورد مطالعه و نمونه گیری: این مطالعه به صورت مقطعی از مهر سال ۱۳۹۰ تا شهریور سال ۱۳۹۱ در سه جزیره ایرانی ابوموسی، تنب بزرگ و سیری (خلیج فارس) بر روی نیروهای نظامی انجام شد. ضمن تکمیل پرسشنامه و رضایت نامه از افراد مورد مطالعه، آنها مورد معاینه قرار گرفتند، مشخصات مربوط به پرسنل اعم از سن، مدت استقرار در منطقه، نوع ضایعه، مدت ابتلا، سابقه بیماری، سابقه خانوادگی، دفعات استحمام و ورزش در هفته و داشتن بیماری زمینه ای در فرم پرسشنامه تهیه شده یادداشت گردید. فرم رضایت نامه کتبی و آگاهانه از بیمار نیز تکمیل شد و بی نام و محرمانه ماندن اطلاعات تضمین گردید. در ادامه، پس از انجام معاینه، از بیمار نمونه گیری از ضایعات مشکوک قارچی توسط وسایل نمونه گیری انجام گرفت، سپس نمونه ها در ظروف استریل به آزمایشگاه تحقیقاتی قارچ شناسی پزشکی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، جهت انجام آزمایش مستقیم (با پتاس ۱۰٪ و یا ۲۰٪ ، رنگ آمیزی با بلودومتیلن و گرم)، کشت (در محیط های S، SC، SCC و SCP) و آزمایشات مولکولی منتقل می گردید.

ویژگی مناطق مورد مطالعه: سه جزیره مورد مطالعه شامل ابوموسی، تنب بزرگ و سیری در پهنه خلیج فارس در جنوبی ترین نقطه ایران واقع شده و جزء استان هرمزگان محسوب می شوند. جزیره ابوموسی جنوبی ترین جزیره ایرانی آب های خلیج فارس است مساحت این جزیره که در ۲۶ درجه خط عرض شمالی و در ۵۵ درجه خط طول شرقی واقع شده‌است، در حدود ۲۵ کیلومتر

مربع می‌باشد. جزیره تنب بزرگ میان َ ۳۴ْ ۵۵ و َ ۲۸ْ ۵۵ طول غربی و َ ۳۰ْ ۲۶ و َ ۳۴ْ ۲۶ عرض شمالی و در فاصله ۴۳/۵ کیلومتری از شمال شرقی جزیره ابوموسی واقع شده است. جزیره تنب بزرگ دارای اقلیم گرم و مرطوب است که هوای آن رطوبت به نسبت بالایی دارد (۸۰ تا ۸۲ درصد در تابستان). دمای هوا در تابستان بین ۲۴ تا ۴۴ درجه سانتیگراد است. جزیره سیری در آب‌های خلیج فارس قرار دارد. فاصله آن تا مرکز شهرستان ابوموسی که در قسمت شرقی جزیره سیری واقع شده در حدود ۲۷ کیلومتر است. وسعت جزیره سیری ۱۷/۳ کیلومتر مربع می‌باشد (۲۳).

شناسایی قارچ های جدا شده: درماتوفیت ها به روش مورفولوژی و از روی خصوصیات کلنی و میکروسکوپی تشخیص داده شد. جنس مالاسزیا به روش مورفولوژی تشخیص داده شد، اما گونه های مالاسزیای عامل تینه آ ورسیکالر و پیتروسپوروزیس (شوره سر) به روش مولکولی شناسایی شدند که برای این کار ابتدا ژنوم قارچ موردنظر موجود در پوسته و تراشه پوستی بیمار استخراج، سپس با پرایمرهای یونیورسال، PCR صورت گرفته و در ادامه محصول PCR تعیین توالی گردید.

روش استخراج DNA: جهت استخراج DNA از پوسته ها و تراشه های مثبت مالاسزیا ها مطابق Gaitanis و همکاران (۱۵) انجام شد که به طور خلاصه به این صورت بود: سوسپانسیونی از مقداری تراشه در ۳۰۰ میکرولیتر بافر CTAB ۵٪ تهیه نموده، نمونه ها را به مدت ۳ دقیقه ورتکس نموده تا مخلوط گردند، در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر دیگر بافر CTAB افزوده، مجدد ورتکس تا هموژنیزه شود. سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

به دنبال آن کلروفرم ایزوآمیل الکل (CI) به نسبت ۲۴ به ۱ افزوده، به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، فاز آبی آن جدا و برابر آن ایزوپروپانول سرد افزوده، سانتریفیوژ نموده تا اسید نوکلئیک رسوب کند. سپس DNA را در اتانول ۷۰٪ شستشو داده و مجدد سانتریفیوژ شد، رسوب حاصل در دمای محیط خشک شده به آن آب مقطر دوبار تقطیر استریل به میزان ۴۰-۳۰ میکرولیتر اضافه گردید.

PCR و تعیین توالی: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (محتوی بافر، dNTP، آنزیم Taq DNA polymerase و $MgCl_2$)، ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر های مورد استفاده با غلظت ۲۰ پیکومول (جدول-۱) و مابقی آب مقطر تزریقی بود.

نحوه انجام PCR: واسرشت ابتدائی (Initial denaturation) در ۹۴ ˚C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ دور از واسرشت (Denaturation) (۹۴ ˚C، ۳۰ ثانیه)، اتصال (Annealing) (۵۶ ˚C، ۴۵ ثانیه و ۵۵˚C، ۳۰ ثانیه برای مالاسزیاها) و گسترش (Extension) (۷۲˚C، یک دقیقه و ۲۰ ثانیه) و در ادامه، گسترش نهائی (Final extension) (۷۲ ˚C، هفت دقیقه) انجام شد.

تعیین توالی: محصول PCR بدست آمده از ژن 26S rRNA گونه های مالاسزیا، از روی ژل استخراج و توسط شرکت زیست فناوری پیشگام تعیین توالی شد. توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Mega 6 و روش دستی در کنار رکوردهای ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی (NCBI) هم ردیف شدند و سپس Blast انجام گرفت.

آنالیز آماری: داده های بدست آمده با روش های آماری توصیفی توسط نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

جدول-۱. توالی پرایمرهای یونیورسال 26S rRNA

پرایمر	توالی
F	5 -TAACAAGGATTCCCCTAGTA- 3
R	5 -ATTACGCCAGCATCCTAAG- 3

نتایج

در این بررسی تعداد ۱۰۲ نفر نیروی نظامی مورد مطالعه قرار گرفتند، که به ترتیب فراوانی در جزایر ابوموسی(۴۲/۲ ٪)، سیری (۳۷/۳ ٪) و تنب بزرگ (۲۰/۵ ٪) قرار داشتند. افراد مورد مطالعه از نظر سنی بیشتر در گروه سنی ۲۴-۲۰ سال (۴۳/۱ ٪) قرار داشتند. از نظر وضعیت تاهل، ۵۱٪ متاهل و ۴۹٪ مجرد بودند. از نظر تحصیلی، ۵۰٪ دیپلم، ۳۰/۴ ٪ زیر دیپلم، ۱۲/۷ ٪ فوق دیپلم و ۶/۹ ٪ لیسانس بودند.

در این مطالعه ۴۳ نفر(۴۲/۱ ٪) دارای ضایعات مشکوک قارچی بودند که پس از بررسی های قارچ شناسی تعداد ۱۷ نفر (۱۶/۷ ٪) به بیماری های قارچی مبتلا بودند. از این تعداد ۱۶ نفر به بیماری های قارچی سطحی و یک نفر به بیماری قارچی جلدی (درماتوفیتوزیس) مبتلا بود. شیوع پیتروسپوروزیس (شوره سر)، تینه آ ورسیکالر و درماتوفیتوزیس به ترتیب ۵۸/۸ ٪، ۳۵/۳ ٪ و ۵/۹ ٪ بود (جداول- ۲ و ۳).

در این بررسی در بیماران مبتلا به تینه آورسیکالر نواحی مختلفی از بدن مبتلا شده بود که به ترتیب شیوع نواحی زیر بغل (۳۰/۸ ٪)، پشت (۲۳٪)، کتف، کشاله ران و گردن هر کدام ۱۵/۴ ٪ علائم بیماری را نشان دادند (جدول-۳).

جدول-۲. شیوع ابتلا به بیماری های قارچی بر حسب نوع جزیره

	تینه آ ورسیکالر		پیتروسپوروزیس (شوره سر)		درماتوفیتوزیس		جمع کل	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
ابوموسی	۵	۸۳/۳	۶	۶۰	۱	۱۰۰	۱۲	۷۰/۶
تنب بزرگ	۰	۰	۱	۱۰	۰	۰	۱	۵/۹
سیری	۱	۱۶/۷	۳	۳۰	۰	۰	۴	۲۳/۵
جمع کل	۶	۱۰۰	۱۰	۱۰۰	۱	۱۰۰	۱۷	۱۰۰

جدول-۳. شیوع بیماری تینه آ ورسیکالر بر حسب محل ضایعه

ناحیه مبتلا	موارد ابتلا	
	تعداد	درصد
زیر بغل*	۴	۳۰/۸
پشت	۳	۲۳
کتف	۲	۱۵/۴
کشاله ران	۲	۱۵/۴
گردن	۲	۱۵/۴
جمع کل	۱۳	۱۰۰

*لازم به ذکر است برخی بیماران در بیش از یک محل مبتلا بودند.

ناحیه آلوده به پیتروسپوروزیس (شوره سر) تنها منحصر به سر بود و در ۱۰ نفر مشاهده شد، ناحیه آلوده به درماتوفیتوزیس تنها کشاله ران و به تعداد یک مورد مشاهده گردید.

از تعداد ۱۷ نفر مبتلا، ۲۹/۴ ٪ در گروه سنی ۲۴-۲۰ سال و همین درصد در گروه سنی ۲۹-۲۵ سال، ۱۱/۸ ٪ در گروه سنی بیشتر از ۴۰ سال و ۵/۹ ٪ در گروه سنی ۳۹-۳۵ سال قرار داشتند. در افراد مبتلا به شوره سر از نظر سن، ۵۰٪ در گروه سنی ۲۹-۲۵ سال، ۳۰٪ در گروه سنی ۳۴-۳۰ سال و ۲۰٪ در گروه سنی ۲۴-۲۰ سال قرار داشتند.

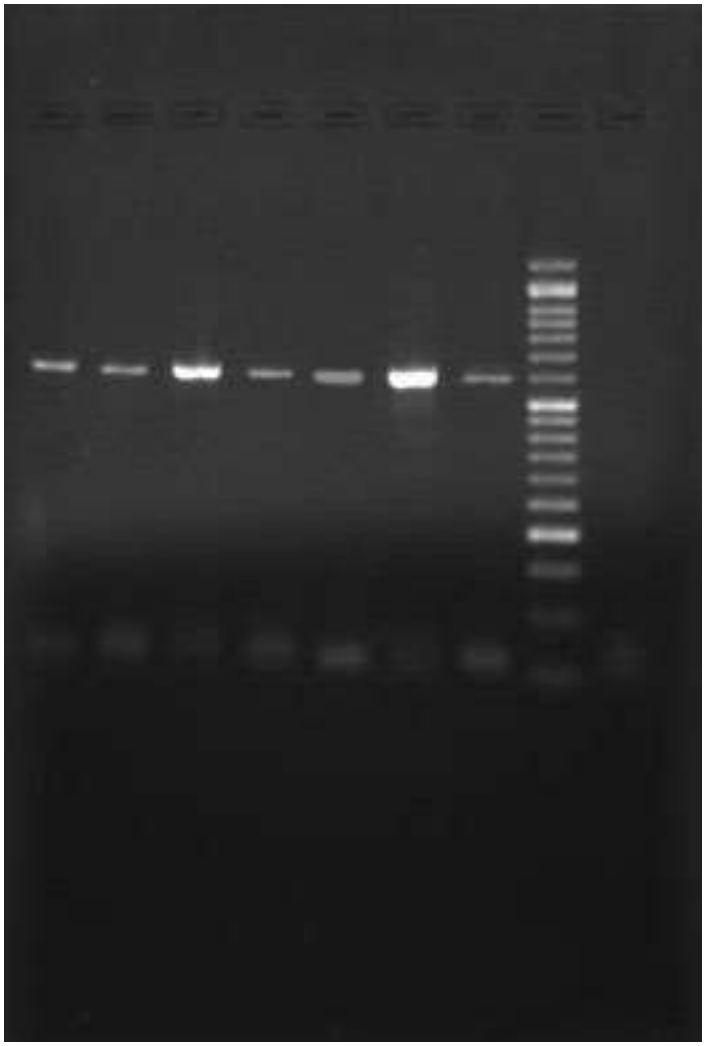
در این بررسی گونه های مالاسزیای شناسایی شده متعلق به دو گونه رستریکتا و گلوبوزا بود. شیوع مالاسزیا رستریکتا به تعداد ۱۰ گونه (۶۲/۵ ٪) و مالاسزیا گلوبوزا به تعداد ۶ گونه (۳۷/۵ ٪) بود. جدول-۴ نتایج شناسایی گونه های مالاسزیا را نشان می دهد. در این بررسی گونه غالب عامل شوره سر، مالاسزیا رستریکتا (۸۰٪) مشاهده شد، همچنین گونه غالب عامل تینه آ ورسیکالر، گونه مالاسزیا گلوبوزا (۶۷٪) بود (جدول-۴). توالی مربوط به دو گونه مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا گلوبوزا و محصول PCR به ترتیب در جدول-۵ و شکل-۱ آمده است.

جدول-٤. شناسایی مولکولی گونه های مالاسزیا در بیماران مبتلا به تینه آ ورسیکالر و پیتیروسپوروزیس به روش PCR-Sequencing

ردیف	کد	گونه مالاسزیا	محل ضایعه
۱	۱	گلوبوزا	کتف و آرنج
۲	۵	رستریکتا	زیر بغل، کمر و کشاله ران
۳	۶	رستریکتا	آرنج، پشت و کشاله ران
۴	۱۲	گلوبوزا	زیر بغل، پشت و کتف
۵	۱۳	رستریکتا	شوره سر
۶	۱۶	رستریکتا	شوره سر
۷	۱۷	گلوبوزا	شوره سر
۸	۲۴	رستریکتا	شوره سر
۹	۳۵	رستریکتا	شوره سر
۱۰	۴۲	گلوبوزا	گردن
۱۱	۴۵	رستریکتا	شوره سر
۱۲	۴۶	رستریکتا	شوره سر
۱۳	۶۹	گلوبوزا	گردن
۱۴	۷۰	گلوبوزا	شوره سر
۱۵	۸۱	رستریکتا	شوره سر
۱۶	۸۵	رستریکتا	شوره سر

جدول ۵. توالی قطعه ای از ژن 26S rRNA مربوط به دو گونه مالاسزیا رستریکتا و مالاسزیا گلوبوزا جدا شده از بیماران مبتلا با روش تعیین توالی (PCR-sequencing)

مالاسزیا رستریکتا	TTAGAAGAATGCGCTCCGATCGTGCAGGTCGTAGTTGCTGGCGTGATTCCGCGTTG TATCTCGAGACGTGTTTTCCGTGCGGCTCTATGGACAAGTCCCTTGGAACAGGGCA TCGTAGAGGGTGAAAATCCCGTACTTGCCATGGAAGTACCGTGCTTTGTGATACAC GCTCCAAGAGTCGAGTAGTTTGGGATTGCTGCTCAAAGTGGGTGGTAGACTCCATC TAAAGCTAAATATCGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAATTGTCGAAAGGGAAGCA CTTGAAGTCAGCCATGCTGCTTGAGACTCAGCCTGGCTTTTGCTTGGTGTATTTCTC GGTAGCAAGCCAGCATTGGTTTGTGTCGTCGGAGAAGCGTATGGGGAATGTGGCAT CCTCGGATGTGTTATAGCCCTGTGCAGGATACGACGACGTAGACCAAGGAACGCA GTGTGCCCTCTGGGCGGGTCTTCGGACACCTTCACACTTAGGATGTGGGCGTAAT
مالاسزیا گلوبوزا	GGGGGTACCTGCGGTATACTGGAGTATAAGCTGATACCTTCGGTGACCGCGTTGTA ATCTCGAGACGTGTTTTCCGTGCGGCTCTATGGACAAGTCCCTTGGAATAGGGCAT CGTAGAGGGTGAGAATCCCGTACTTGCCATGGAAGAACCGTGCTTTGCGATACACG CTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCTCAAAATGGGTGGTAGACTCCATCT AAAGCTAAATATCGGGGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGAT GAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAGTACGTGAAATTGTCGAAAGGGAAGCA CTTGAAGTCAGCCATGCTGCTTGAGACTCAGCCTGGCCTTTGGGCTTGGTGTATTTC TCGGTGGCAAGCCAGCATTGGTTTGGGTCGTCGGAGAAGCGCATAGGGAATGTGG CGTCTCCGGACGTGTTATAGCCTTATGCAGGATACGACGACCTGGATCAAGGAACG CAGTGTGCCCTCTGGGCGGGTCTTCGGACACCTTCACACTTAGGAGCGGGGCCGTA ATAAAAGGGGGGGGGGAGCAAAAAGAAAAAAAGGGGGGCGACATGGCGGGGG CTCCCCCCCGGGGGGTCATCCGCCCCTTTACC



شکل-۱. باندهای حاصل از PCR (محصول ۵۵۰ bp) و الکتروفورز ژنوم تعدادی از مالاسزیاها مطالعه حاضر با پرایمرهای یونیورسال قارچی مربوط به ژن 26S rRNA، از سمت راست، کنترل منفی، مارکر، تعدادی از نمونه های مثبت مالاسزیا

بحث

شایع ترین بیماری قارچی در مطالعه حاضر بیماری قارچی سطحی پیتروسپوروزیس (شوره سر) (۵۸/۸ ٪) و تینه آ ورسیکالر (۳۵/۳ ٪) بود که با بررسی های قبلی که بر پرسنل نظامی صورت گرفته بود مطابقت دارد، افشاری، و همکاران در سال ۱۳۸۸ در بررسی بیماری های قارچی سطحی و جلدی در مراکز آموزش نظامی تهران بیماری پیتروسپوروزیس (۵۴٪) و تینه آ ورسیکالر (۴۴٪) را شایع ترین بیماری ها گزارش کردند (۲۲). البته درصد شیوع این دو بیماری بسته به نوع مطالعه، محل و زمان مطالعه و شرایط بیمار متفاوت گزارش شده است، افشاری در بررسی پرسنل نظامی نیروی دریایی در سال ۱۳۷۹ شایع ترین بیماری قارچی را تینه آ ورسیکالر (۶۳٪) گزارش نمود و پیتروسپوروزیس (۲۷٪) را در مرتبه دوم فراوانی گزارش کرد(۲۰)، همچنین افشاری در دیگر بررسی در جانبازان فراوانی تینه آ ورسیکالر (۵۷/۵ ٪) را بیشتر از پیتروسپوروزیس (۳۲/۵ ٪) گزارش نمود (۲۱).

در مطالعه انجام گرفته در پرسنل نیروی دریایی و مراکز آموزشی نظامی تهران، بیشترین آلودگی قارچی در گروه سنی ۲۴-۲۰ سال گزارش شده است، همچنین در بررسی های صورت گرفته در بین رزمندگان و همچنین جانبازان قطع نخاع، گروه های سنی ۲۵-۲۰ و ۲۹-۲۵ ساله، دارای بیشترین مبتلایان به بیماریهای قارچی بودند (۲۴، ۲۱، ۲۰). Ingordo و همکاران میانگین سنی ابتلای ملوانان ایتالیایی را به بیماری های قارچی سطحی ۲۲ سال گزارش نموده اند (۲۵). در این بررسی بیشتر افراد مبتلا در گروه سنی ۲۴-۲۰ سال (۲۹/۴ ٪) و ۲۹-۲۵ سال (۲۹/۴ ٪) قرار داشتند، همچنین افراد مبتلا به شوره سر (۵۰٪) در گروه سنی ۲۹-۲۵ سال قرار داشتند، که دلیل آن می تواند فعالیت بیشتر غدد سباسه در این سنین ذکر کرد، همچنین وجود استرس، چرب بودن موهای سر آنها و به موقع استحمام ننمودن می تواند دلائلی باشد که مخمر چربی دوست مالاسزیا از حالت نرمال به فرم مهاجم تبدیل شود و علائم بیماری را چه به صورت شوره سر و یا به صورت لک های پوستی در نواحی مختلف بدن بروز نماید.

در این مطالعه فراوانترین گونه مالاسزیای عامل بیماری پیتروسپوروزیس، مالاسزیا رستریکتا (۸۰٪) بود که با بررسی Dawson و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Hay و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت دارد (۱۳، ۱۲)، همچنین در این بررسی شایع ترین گونه عامل تینه آ ورسیکالر مالاسزیا گلوبوزا (۶۷٪) بود که با مطالعات انجام شده در ایران و سایر نقاط جهان مطابقت دارد، ناظری و همکاران در سال ۸۷ مالاسزیا گلوبوزا (۸۰/۴ ٪) را گونه غالب بیماری تینه آ ورسیکالر گزارش کردند (۲۶)، خسروی و همکاران در سال ۸۸ مالاسزیا گلوبوزا (۸۵/۴ ٪) را شایع ترین عامل تینه آ ورسیکالر معرفی نمودند (۲۷)، Rasi و همکاران در سال ۲۰۱۰ گونه غالب عامل بیماری تینه آ ورسیکالر را مالاسزیا گلوبوزا (۳۱/۳ ٪) گزارش نمود (۲۸). محمودی راد و همکاران در سال ۱۳۹۰ در بررسی خود به روش PCR-RFLP گونه های مالاسزیا فور فور (۳۶/۷ ٪) و مالاسزیا گلوبوزا (۳۰٪) را فراوانترین گونه های عامل تینه آ ورسیکالر معرفی نمودند (۱۷). Gupta و همکاران همچنین Aspiroz و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Gaitanis و همکاران در سال ۲۰۰۶ مالاسزیا گلوبوزا را گونه غالب عامل بیماری تینه آ ورسیکالر معرفی نمودند (۳۰، ۲۹، ۱۴).

در این بررسی گونه های مالاسزیا به روش مولکولی و از طریق تعیین توالی شناسایی شدند که در ایران به ندرت این شیوه شناسایی شده اند، میرهندی و همکاران در سال ۲۰۰۵ به روش PCR-RFLP گونه های مالاسزیا را شناسایی نمودند (۱۸)، همچنین محمودی راد و همکاران در سال ۱۳۹۰ در دو مطالعه که بر روی بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک و تینه آ ورسیکالر انجام دادند گونه های مالاسزیا را به روش PCR-RFLP شناسایی نمودند (۱۷، ۱۶)، Gaitanis و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز به روش PCR-RFLP از ناحیه ژنی ITS2، ۱۱ گونه مالاسزیا را شناسایی نمودند (۱۴).

اولین بار در سال ۲۰۰۲ Gaitanis و همکاران اقدام به استخراج DNA از تراشه پوسته مثبت تینه ا ورسیکالر به منظور شناسایی مولکولی گونه های مالاسزیا نمودند (۱۵). اکثر مطالعات انجام شده با استفاده از کیت استخراج بوده است، در ایران محمودی راد طی دو مطالعه خود در سال ۹۰ به روش استفاده از کیت DNA را از تراشه مستقیم بیمار جدا نمودند (۱۷، ۱۶)، در دیگر مطالعات توسط Gaitanis و همکاران انجام شده است که نشان از جداسازی ژنوم به روش دستی است اما در ایران تمام مطالعات انجام شده یا به روش کیت بوده و یا از کلنی رشد یافته در محیط کشت اقدام به استخراج ژنوم کرده اند، زارعی و همکاران (داده های منتشر نشده) برای اولین بار در ایران به روش دستی با استفاده از بافر CTAB از نمونه مستقیم تراشه بیمار DNA مالاسزیاها را استخراج نمود در این بررسی نیز به همین روش، ژنوم مالاسزیاها جدا گردید.

امروزه شناسایی گونه های مالاسزیا بر اساس تست های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام می گیرد که با این تست ها غالباً وقت گیر بوده و به نیروی متخصص نیاز دارند؛ از این رو در اکثر آزمایشگاه های تشخیص طبی، انجام نمی شود و شناسایی مالاسزیا تنها در حد جنس، صورت می گیرد؛ همچنین از آنجا که تمام گونه های مالاسزیا 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 (۳۱)، برای درمان موفق، شناسایی عامل مولد بیماری تا حد گونه و انجام تست های ارزیابی حساسیت دارویی بر روی آنها ضروری است.

با توجه به محدودیت های نظامی، امکان نمونه برداری بیشتر در این جزایر وجود نداشت. مطالعات محدود دیگر انجام شده در جزایر مذکور نیز با محدودیت های مشابه مواجه بوده اند (۳۲).

تحقیق حاضر اولین مطالعه قارچ شناسی در نظامیان مستقر در جزائر

ابوموسی، تنب بزرگ و سیری بود. بیماری های قارچی علاوه بر ضایعات جلدی، باعث ایجاد نگرانی و صدمات روحی و روانی در سربازان می شود، نتایج حاصل از این مطالعه می تواند به کارکنان بهداشت و درمان و پزشکان شاغل در جزایر در جهت تشخیص و درمان سریع و صحیح بیماریهای قارچی کمک نماید.

نتیجه‌گیری

شایع ترین بیماری قارچی در مطالعه حاضر پیتروسپوروزیس (شوره سر) و تینه آ ورسیکالر بود که با بررسی های قبلی که بر روی پرسنل نظامی صورت گرفته بود مطابقت داشت، ژنوم مخمر های عامل این دو بیماری در این مطالعه به روش دستی استخراج و از طریق تعیین توالی شناسایی گردید که به ندرت در ایران انجام گرفته است.

تشکر و قدردانی: این مطالعه با حمایت مادی و معنوی (۹۰-۸۱۱ ، ۹۰/۷/۱۶) مرکز تحقیقات بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا ...(عج) و فرماندهی بهداری نیروی دریایی سپاه به انجام رسیده است. از مسئولین امر و کلیه نیروهای ساکن در جزایر سه گانه که در انجام این مطالعه صمیمانه ما را یاری نمودند، تشکر می نماییم.

تضاد منافع: بدینوسیله نویسندگان تصریح می نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Richardson MD. Fungal infection diagnosis and management, 4th ed. Black Well; 2007.
2. Sharma R, Sharma G, Sharma M. Anti-Malassezia furfur activity of essential oils against causal agent of Pityriasis versicolor disease. Afr J Pharm Pharmacol 2012; 6: 979-983.
3. Falahati M, Pakshir K, Alinejad Talesh K. Separation and Identification of Different Species of Malassezia in Patients Referred to Medical Centers in Shiraz. RJMS. 2005; 12 (45):133-140.
4. Zeini F, Mahbod AA, Emami M. Medical mycology. 5th Ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Publications, 2013.
5. Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. PLoS Pathog. 2015 8;11(1):e1004523.
6. Gaitanis G, Bassukas ID, Velegraki A. The range of molecular methods for typing Malassezia. Curr Opin Infect Dis 2009; 22:119 –225.
7. Glatz M, Bosshard PP, Hoetzenecker W, Schmid-Grendelmeier P. The Role of Malassezia spp. in Atopic Dermatitis. J Clin Med 2015 ; 29:4(6):1217-28.
8. Ashbee HR. Update on the genus Malassezia. Med Mycol. 2007; 45: 287–303.
9. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. Clin Microbiol Rev 2012; 25: 106–141.
10. Gueho E, Boekhout T. The role of malassezia species in the ecology of human skin and as pathogens. Medical mycology 1998;36(supp1):220-9.
11. Honnavar P, Prasad GS, Ghosh A, Dogra S, Handa S, Rudramurthy SM. Malassezia arunalokei sp. nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. Journal of clinical microbiology. 2016 Jul 1;54(7):1826-34.
12. Hay RJ Malassezia, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview. Br J Dermatol. 2011;165: 2:2-8.
13. Dawson TL. Malassezia globosa and restricta: breakthrough understanding of the etiology and treatment of dandruff and seborrheic dermatitis through whole-genome analysis. J Investig Dermatol Symp Proc 2007; 12:15–19.
14. Gaitanis G. Distribution of Malassezia species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate M. globosa. British J of Dermatol 2006; 154: 854-9.
15. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, et al. Identification of Malassezia species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 162-73.
16. Mahmoudi Rad M, Miramin Mohammadi A, Tousi P, Firooz A, Eskandari SE, Mahmoudi Rad N, Mirdamadi Y, Ehsani A, Ghasemi Z, Younespour S. Identification of Malassezia species associated with seborrheic dermatitis using PCR-RFLP. Journal of Dermatology and Cosmetic. 2011 Jun 1;2(2):98-10.
17. Mahmoudi Rad M, Miramin Mohammadi A, Tousi P, Khamesipour A, Ehsani A, Eskandari SE, Mahmoudi Rad N, Mirdamadi Y, Ghasemi Z, Gerami Shoar M, Younespour S. Identification of Malassezia species associated with pityriasis versicolor using PCR-RFLP. Journal of Dermatology and Cosmetic. 2011 Jun 1;2(2):106-14.
18. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K,Yamada T, Sugita T,Yamaguchi H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 Malassezia species. J Microbiol Methods 2005; 61: 281–4.
19. Didehdar M, Mehbod AS, Eslamirad Z, Mosayebi M, Hajihossein R, Ghorbanzade B and et al. Identification of Malassezia Species Isolated from Patients with Pityriasis Versicolor Using PCR-

RFLP Method in Markazi Province, Central Iran. Iran J Public Health. 2014; 43(5): 682-6.
20. Afshari MA. Fungal diseases in military of persian gulf and khazar sea aways. J Mil Med. 2000; 2 (3):107-110.
21. Afshari MA. Cutaneous and superficial fungal diseases in chemical injuries in Tehran. J Med Kosar 2000; 5(3): 189-94.
22. Afshari M A, Kachuei R, Riazipour M. Cutaneous and superficial fungal diseases in military training camps of Tehran. J Mil Med 2009;11(1):45-49.
23. Karegar A. Ownership of Tree Island. 1st ed. Tehran:Sepah Navy Publication; 2003.
24. Ghahri M. Fungal infections in chemical injuries. MSc thesis, Tehran, Faculty of health Tehran university of Medical Sciences, 1988.
25. Ingordo V, Naldi L, Colecchia B, Licci N. Prevalence of pityriasis versicolor in young Italian sailors. Br J Dermatol. 2003;149:1270–2.
26. Nazeri M, Shokuh Amiri M, Moniri R, Moaiieri M, Marvuji A, Asgharim B. Identification of various Malassezia species in pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients in Kashan. J Med Kosar 2008; 293-6.
27. Khosravi A R, Hedayati M T, Mansouri P and et al. Immediate hypersensitivity to *Malassezia furfur* in patients with atopic dermatitis. Mycoses 2007; 50: 297–301.
28. Rasi A, Naderi R, Behzadi AH, Falahati M, Farehyar S, Honarbakhsh Y, et al. Malassezia yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study. Mycoses 2010; 53(4): 350-5.
29. Aspiroz C, Ara M, Varea M, Rezusta A, and Rubio C. Isolation of Malassezia globosa and M. sympodialis from patients with pityriasis versicolor in Spain. Mycopathologia 2002; 154:111-117.
30. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin diseases associated with Malassezia species. J Am Acad Dermatol. 2004; 51: 785–798.
31. Shams M, Amanlu S, Moghadam F, Mirza Hosseini H. Identification of the commone Malassezia species in Iran using PCR-RFLP. J Med Sci. 2009; 9(1): 37-42.
32. Khoobdel M, Akbarzadeh K, Jafari H, Mehrabi Tavana A, Izadi M, Mosavo Jazayeri A,et al. Ant sting in military forces on three Persian islands of Abu-Musa, Great Tonb and Lesser Tonb. Iranian J Mil Med 2012; 14(2): 155-162.