بررسی فراوانی مخمرهای مالاسزیا در افراد سالم و بیماران مبتلا به درماتیت سبوروئیک

مریم سرلک[1]، محبوبه مدنی [2]، محمدعلی ضیاء[3]

۱. کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان (مؤلف مسئول)

۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

۳. استادیار علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)

مندیش / دوره سوم / شماره۴ و ۵/ زمستان ۱۳۹۱

چکیده

◈ مقدمه و هدف: مخمرهای جنس مالاسزیا، مخمرهای بازیدیومایست چربی دوست هستند که به صورت اعضاء میکروبی فلور اغلب حیوانات خونگرم و انسان مطرح می‌باشند. درماتیت سبورئیک یک بیماری التهابی مزمن درسطح پوست می‌باشد که بیشتر در مردان بالغ مشاهده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی مالاسزیا در عشایر بختیاری لرستان بوده است.

◈ مواد و روش ها: نمونه‌گیری با روش تراشه‌برداری از شوره‌های سر و پشت گوش‌ها انجام شد. نمونه‌ها از ۱۰۰ نفر (۵۰ نفر سالم و ۵۰ نفر مبتلا به درماتیت سبورئیک) گرفته و بر روی محیط لیمینگ-نوتمن آگار اصلاح شده کشت شد. مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بر روی کلنی‌های مالاسزیا در کشت خالص انجام شد.

◈ یافته ها: در این بررسی میزان مشاهده سلول‌های مخمری در مجموع نمونه‌های بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک برابر ۲۷ مورد (۵۴٪) بود و همچنین ۱۷ مورد (۳۴٪) کلنی‌های مخمری رشد نمودند. در افراد سالم نیز در کل میزان مشاهده سلول‌های مخمری در نمونه‌ها برابر ۲۴ مورد (۴۸٪) بود و همچنین ۱۴ مورد (۲۸٪) کلنی‌های مخمری رشد نمودند.

◈ نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد مخمرهای مالاسزیا در ۵۱٪ از نمونه‌ها در آزمایش مستقیم و ۳۱٪ از نمونه‌ها در کشت جدا شد.

◈ واژهای کلیدی: مالاسزیا، درماتیت سبوروئیک، محیط کشت لیمینگ، نوتمن آگار اصلاح شده، شوره سر.

مقدمه

مخمرهای فرصت‌طلب مالاسزیا متعلق به شاخه بازیدیو-میکوتا، رده هتروبازیدیومیست‌ها، راسته اوسیتلاجینال‌ها و خانواده کریپتوکوکاسه هستند[1]. گونه‌های مالاسزیا تمایل زیادی به چربی دارند لذا از این ویژگی برای شناسایی آن‌ها استفاده می‌شود. تاکنون ۱۴ گونه مالاسزیا بر اساس مطالعات مرفولوژیک، فراساختمانی، فیزیولوژیک و ژنتیک شناسایی شده‌اند. این مخمر فلور نرمال اغلب مهره‌داران خونگرم از جمله انسان و انواعی از پستانداران و پرندگان می‌باشد. در هر حال تراکم جمعیتی مالاسزیا در ضایعات جلدی عفونی شده، عموماً بیشتر از پوست سالم است و به نظر می‌رسد تکثیر مخمرها اولین گام برای ایجاد درماتیت مالاسزیائی می‌باشد. درماتیت سبوروئیک یک بیماری التهابی مزمن در سطح پوست می‌باشد که بیشتر در پوست سر، ابروها، شیارهای بین دهان و بینی، سینه، زیربغل، ناف، کشاله ران و ناحیه شکاف باسن رخ می‌دهد. در این بیماری پوسته‌ریزی چرب و زرد رنگ بر روی سطح قرمز پوست ایجاد می‌شود. خارش در این بیماری می‌تواند شدید باشد. درماتیت سبوروئیک یک مشکل خیلی شایع و بی‌عارضه است که در ٪۳ مردم دیده می‌شود. شیرخواران می‌توانند مبتلا شوند ولی معمولاً پس از چند ماه خوب می‌شوند. درماتیت سبوروئیک در بزرگسالان جوان شایع است و در سنین حدود چهل بیشترین شیوع دیده شده و در افراد پیر کمتر است. عواملی نظیر پوست چرب، درمان کورتیکو استروئیدی و نقص ایمنی موجب افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های ناشی از مالاسزیا می‌باشد. دمای بالای محیط و رطوبت نسبی بالا در ایجاد بیماری‌های ناشی از مالاسزیا تأثیر دارد [2,3]. اگر چه کورتیکو استروئیدهای موضعی در درمان سبوروئیک مؤثرند ولی تعداد ارگانیسم قبل و بعد از درمان با استروئیدها تغییری نشان نمی‌دهد. احتمالا این ارگانیسم‌ها مستعدکننده بیماری می‌باشند که از طریق فعال کردن کمپلمان به روش آلترناتیو باعث ایجاد التهاب می‌شوند. در عین حال این احتمال نیز وجود دارد که افزایش آن‌ها ثانویه بوده و به دنبال افزایش ترشح سبوم رخ دهد[10,11]. هدف از این مطالعه بررسی میزان فراوانی مخمرهای مالاسزیا در افراد سالم و مبتلایان به بیماری درماتیت سبوروئیک در عشایر بختیاری بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به مدت ۶ ماه و در عشایر بختیاری لرستان انجام شد. در این بررسی ۱۰۰نمونه (۵۰ فرد سالم و۵۰ نفر بیمار مبتلا به درماتیت سبورئیک) مورد مطالعه قرار گرفتند. افراد مورد مطالعه در فاصله سنی ۱۵-۴۰ سال قرار داشتند. نمونه‌گیری از نواحی شوره‌دار سر و پشت گوش‌ها انجام شد. از این تعداد ۲۰ نفر دارای شوره در ناحیه پشت گوش و ۳۱ نفر دارای شوره سر بودند. به این منظور با اسکالپل استریل به آرامی نواحی شوره‌دار پوست را تراشیده و پوسته‌ها در داخل پاکت تمیز جمع‌آوری شدند. پس از ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه با روش رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو و لام مرطوب مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. همچنین کلیه نمونه‌ها در محیط لیمینگ نوتمن آگار اصلاح شده (*Modified Leeming & Notman Agar= MLNA*) کشت شد. این محیط کشت شامل پپتون (۱۰گرم)، گلوکز (۱۰گرم)، عصاره‌ی مخمر (۲گرم)، گلیسرول مو نو استئارات (۰/۵ گرم)، آگار (۱۵گرم)، گلیسرول (۱۰ میلی‌لیتر)، توئین ۶۰ (۵ میلی‌لیتر)، اوکس بایل (۸گرم)، کلرامفنیکل ۵٪، سیکلوهگزیمید ۵٪ در یک لیتر آب مقطر می‌باشد[8,9]. توسط آنس استریل نمونه‌های تهیه شده از بیماران و افراد سالم در سطح محیط کشت تلقیح شد. جهت جلوگیری از تبخیر آب موجود در محیط کشت، پلیت‌های تلقیح شده در کیسه فریزر قرارداده شد و در انکوباتور ۳۲ ^{o}C به مدت ۷-۱۴ روز انکوبه گردید. تمام محیط‌های کشت به صورت روزانه، از نظر تشکیل کلنی مخمری بررسی شدند. جهت بررسی و شناسایی کلنی‌های مخمری مالاسزیایی کلیه کشت‌ها به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌های مخمری پس از ۵ تا ۱۲ روز ظاهر شدند. مشخصات کلنی‌ها عبارت از کلنی‌هایی با قوام خامه‌ای، محدب، برآمده، درخشان یا کدر و دارای حاشیه‌ی صاف یا چین‌خورده بود[3]. با توجه به رشد قارچ‌های ساپروفیت در برخی از محیط‌های کشت حاوی کلنی‌های مخمری، برای خالص‌سازی کلنی‌های مخمری کشت مجدد آن‌ها در محیط‌های ثانویه انجام گرفت.

یافته‌ها

در مشاهده میکروسکوپی، نمونه‌های دارای سلول‌های مخمری گرد یا بیضی شکل دارای جوانه با پایه‌های پهن یا باریک یا بدون جوانه همراه با مسیلیوم‌های کوتاه و بلاستوکنیدی بعنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته شد. تعداد ۵۰ نفر مبتلا به بیماری درماتیت سبورئیک از نظر وجود سلول‌های مخمری، مورد آزمایش مستقیم میکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج در جدول ۱ مشاهده می‌شوند. میزان مشاهده سلول‌های مخمری در مجموع نمونه‌ها برابر ۲۷ مورد (۵۴٪) بود. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود میزان فراوانی مشاهده مخمر در بیماران مرد نسبت به بیماران زن و نمونه‌های سر نسبت به نمونه‌های پشت گوش بیشتر بود. از تعداد ۵۰ نمونه کشت شده در محیط فوق‌الذکر، در مجموع در ۱۷ مورد (۳۴٪) کلنی‌های مخمری رشد نمود. نتایج به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌برداری در جدول ۲ مشاهده می‌شود. میزان درصد رشد کلنی‌های مخمری در محیط کشت MLNA در نمونه‌های مربوط به مردان بیشتر از زنان بود. تعداد ۵۰ نمونه نیز از افراد سالم از نظر وجود سلول‌های مخمری، مورد آزمایش مستقیم میکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج در جداول ۳ و ۴ مشاهده می‌شوند. میزان مشاهده سلول‌های مخمری در مجموع نمونه‌ها برابر ۲۴ مورد (۴۸٪) بود. میزان درصد رشد کلنی‌های مخمری در محیط کشت MLNA در نمونه‌های مربوط مردان بیشتر از زنان بود و بیشترین درصد رشد کلنی‌ها در ناحیه تنه مشاهده شد.

جدول ۱: نتایج آزمایش مستقیم مربوط به نمونه‌های بیماران مبتلا به درماتیت سبوروئیک به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌گیری

جنس	مرد		زن	
محل نمونه‌گیری	مشاهده سلول مخمری	تعداد کل	مشاهده سلول مخمری	تعداد کل
سر	۱۷ ٪۶۲/۹۲	۲۷	۵ ٪۴۵/۴۵	۱۱
پشت گوش‌ها	۳ ۳۷۵/۵	۸	۲ ٪۵۰	۴
جمع کل	۲۰ ٪۵۷/۱۴	۳۵	۷ ٪۴۶/۶۶	۱۵

جدول ۲: نتایج کشت مربوط به نمونه‌های بیماران مبتلا به درماتیت سبوروئیک به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌گیری

جنس	مرد		زن	
محل نمونه‌گیری	کشت	تعداد کل	کشت	تعداد کل
سر	۱۲ ٪۴۴/۴۴	۲۷	۳ ٪۲۷/۲۷	۱۱
پشت گوش‌ها	۱ ٪۱۲/۵	۸	۱ ٪۲۵	۴
جمع کل	۱۳ ٪۳۷/۱۴	۳۵	۴ ٪۲۶/۶۶	۱۵

جدول ۳ : نتایج آزمایش مستقیم نمونه‌های مربوط به افراد سالم به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌گیری

جنس	مرد		زن	
محل نمونه‌گیری	آزمایش مستقیم	تعداد کل	آزمایش مستقیم	تعداد کل
سر	۹ ٪۶۹/۲	۱۳	۶ ٪۴۶/۱۵	۱۳
پشت گوش‌ها	۴ ٪۳۳/۳	۱۲	۳ ٪۲۵	۱۲
جمع کل	۱۴ ٪۵۶	۲۵	۱۰ ٪۴۰	۲۵

جدول ۴: نتایج کشت مربوط به افراد سالم به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌گیری

جنس	مرد		زن	
محل نمونه‌گیری	کشت	تعداد کل	کشت	تعداد کل
سر	۷ ٪۵۳/۸۴	۱۳	۵ ٪۳۸/۴۶	۱۳
پشت گوش ها	۲ ٪۱۶/۶۶	۱۲	۱ ٪۸/۳۳	۱۲
جمع کل	۹ ٪۳۶	۲۵	۶ ٪۲۴	۲۵

بحث و نتیجه‌گیری

بیش از یک قرن است که مخمرهای چربی‌دوست نظیر گونه‌های جنس مالاسزیا، به عنوان بخشی از فلور نرمال پوست انسان و حیوانات خونگرم مطرح هستند[۴،۳]. گزارشات متعدد بیانگر این ادعا است که این مخمرهای ساپروفیت می‌توانند تحت برخی شرایط به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب در انسان و حیوان عمل کنند[۸، ۹]. گونه‌های مالاسزیا طیف وسیعی از آنزیم‌ها شامل لیپازها، فسفولیپازها و هیدرولاز را تولید می‌کنند. لیپازها برای تأمین چربی‌های مورد نیاز قارچ جهت رشد، ضروری هستند[۲]. بسیاری از مطالعات به بررسی شیوع گونه‌های جدیدتر، بر روی پوست نرمال توجه داشته و نتایج متفاوتی در کشورهای مختلف به دست آمده است. در مطالعه حاضر دو گروه از افراد شامل بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک و افراد سالم در سنین ۱۵ تا ۴۰ سال، به تفکیک جنسیت و محل نمونه‌گیری از نظر توزیع مخمرهای مالاسزیا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشانگر میزان جداسازی و رشد بیشتر مخمر در محیط کشت در نمونه‌های مربوط به مردان نسبت به زنان بود، که می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان ترشح سبوم، نوع و مقدار هورمون‌های جنسی، میزان رعایت بهداشت و شغل افراد باشد. عوامل خارجی و داخلی نظیر دمای زیاد، رطوبت نسبی بالا، پوست چرب، درمان کورتیکواستروئیدها و نقص ایمنی می‌تواند باعث بیماری‌زا شدن این مخمرها شود[۱۰]. لذا اهمیت آن‌ها به عنوان پاتوژن‌های مضر در انسان در حال افزایش است. جهت بررسی دقیق‌تر و حصول کلنی‌های مخمری مالاسزیا، کلیه نمونه‌ها تراشه در محیط‌های کشت MLNA تلقیح گردید، در گذشته از محیط سابورو دکستروز آگار که سطح آن با روغن زیتون یا اسید اولئیک پوشیده می‌شد برای جداسازی مخمرهای مالاسزیا استفاده می‌گردید، اما تعدادی از گونه‌ها در این محیط قادر به حیات نیستند، لذا مطالعات مختلف، محیط‌های متفاوتی را جهت جداسازی این مخمرها پیشنهاد نمودند. یکی از محیط‌های مناسب برای جداسازی این مخمرها، محیطی است که توسط لیمینگ و نوتمن توصیه و بعداً با اصلاحاتی که بر روی آن انجام شد به نام محیط لیمینگ- نوتمن اصلاح شده و یا *Modified Leeming & Notman Agar (MLNA)* نام گذاری شد، که دوام طولانی‌تری برای حیات مخمر و ضمناً میزان حصول بیشتر مخمر از پوست را امکان‌پذیر می‌کند[۵، ۶]. همچنین سندسترم فالک نیز در مطالعه خود گزارش می‌کند که این محیط مؤثرترین محیط برای جداسازی مخمرهای مالاسزیا است[۱۱]. در این مطالعه از محیط MLNA برای جداسازی مخمرهای مالاسزیا استفاده کردیم، برای اطمینان از جداسازی تمام گونه‌ها، انکوباسیون در درجه حرارت ۳۷-۳۲ ^{o}C با یک اتمسفر مرطوب ضروری است و محیط‌های کشت باید تا دو هفته در این شرایط نگهداری تا امکان رشد تمام گونه‌ها میسر گردد، لذا در مطالعه ما نیز کلیه نمونه‌های کشت شده در این محیط با همین شرایط نگهداری شدند. در مطالعه‌ای که گوپتا و همکارانش در مورد اپیدمیولوژی مخمرهای مالاسزیا انجام دادند، گزارش کردند که حصول گونه‌های مالاسزیا در کشت خالص از نمونه‌های ضایعات، با وجود استفاده از محیط و تکنیک‌های کاملاً مناسب برای کشت این ارگانیسم‌ها، در کم‌تر از ۵۰٪ موارد موفقیت‌آمیز بود[۱۰]. در سال ۱۳۸۵ علی‌نژاد طالش و همکاران در شیراز به جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف مالاسزیا روی محیط کشت دیکسون آگار پرداختند که بیشترین گونه جداسازی شده مالاسزیا فور فور در ناحیه گردن بود[۲]. در تحقیق *Gueho* در سال ۱۹۹۸ هفت گونه مالاسزیا در محیط سابورو دکستروز آگار همراه با روغن زیتون شناسایی شد[۸]. در سال ۲۰۰۱ *Gueho* و *Guillot* محیط کشت دیکسون آگار را جهت رشد قارچ به کار بردند [۹،۸]. در بررسی بیماران مبتلا به درماتیت سبورئیک ۲۷ نمونه از ۵۰ مورد مطالعه شده در آزمایش مستقیم وجود قارچ را مشخص کردند ولی از این تعداد فقط۳۴٪ از نمونه‌ها روی محیط کشت رشد کردند. Gupta و همکاران در یک مطالعه اپیدمیولوژیک در مورد مخمرهای مالاسزیا گزارش کردند که حصول این مخمرها در کشت خالص از نمونه‌های ضایعات، با وجود استفاده از محیط و تکنیک‌های کاملاً مناسب برای کشت، در کمتر از ۵۰٪ موارد موفقیت‌آمیز بوده است [۱۰،۹]. اما در مطالعه ما بر روی مبتلایان به درماتیت سبورئیک ۵۴٪ نمونه‌های مثبت در آزمایش مستقیم، در محیط‌های کشت رشد نموده و کلنی مخمری را تشکیل دادند. در مطالعه بر روی افراد سالم ۴۸٪ نمونه‌ها آزمایش مستقیم مثبت و ۴۰٪ نمونه‌ها کشت مثبت را نشان دادند. Gueho در سال ۱۹۹۷ مشاهده کرد که تمام گونه‌های مالاسزیا را می‌توان از نواحی مختلف بدن جداسازی کرد[۷]. در این بررسی نمونه‌ها از نواحی شوره‌دار سر

و پشت گوش‌ها اخذ گردید میزان موارد مثبت هم در آزمایش مستقیم و هم در کشت در نمونه‌های مربوط به مردان بیشتر از زنان بود، لذا با توجه به نتایج این تحقیق می توان استنباط کرد که مردهای بالغ بیشتر دچار این بیماری می‌شوند و احتمالاً عوامل مختلف مثل عوامل هورمونی، فعالیت‌های فیزیکی، تعریق بیشتر و عدم رعایت بهداشت فردی در این امر دخیل باشد. جهت بررسی دقیق تر عوامل گوناگون باید تعداد بیشتری بیمار را در سنین مختلف و نواحی مختلف مورد بررسی قرار داد.

هدف از این مطالعه جداسازی و تعیین هویت مخمرهای مالاسزیا در حد جنس بود و در مطالعات آتی با استفاده از روش‌های فیزیولوژیک و مولکولی، مالاسزیاهای جدا شده را در حد گونه شناسایی خواهیم کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از اساتید محترم سرکار خانم دکتر محبوبه مدنی و جناب آقای دکتر محمدعلی ضیاء و همچنین جناب آقای دکتر سعید فروغی معاونت آموزشی دانشکده پرستاری الیگودرز کمال تشکر را دارم.

Reference

1.Ashbee,H.R. Update on the genus Malassezia. Medical Mycology; 2007; 45(4):287-303
2.Cafarchia, C. Gallo, S. Capelli, G. Otranto, D.Occurrence and population size of Malassezia spp. In the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. Mycopathologia; 2005;160(2):143-9
3.Crespoerchiga V, Ojeda Martos A. Malassezia globosa as the causative agent of pityriasis versia color, British journal of dermatology ;2000; 143: 799-803.
4.Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos E.C, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of Malassezia species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate M. globosa. Br J Dermatol; 2006; 154(5):854-9.
5. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The Malassezia Genus in Skin and Systemic Diseases . Clin. Microbiol. Rev; 20012; 25(1): 106-141.
5. Gueho E, Boekhout T. The role of malassezia species in the ecology of human skin and as pathogens. Medical mycology ;1998; 36(supplement 1): 220-9.
6. Gupta, A.K. Kohli, Y. Summerbell. R.C. Molecular differentiation of seven Malassezia species. J. Clin Microbiol; 2000; 38(5):1869-75
7. Gupta, A.K., Kohli, Y., Faergemann, J., Summerbell. R.C. Epidemiology of Malassezia yeast associated with pityriasis versicolor in Ontario,Canada,Med.Mycology;2001; 39:199-206
8.Gupta, A.K., Boekhout, T., Theelen, B., Summerbell, R., Barta, R. Identification and typing of Malassezia species by Amplified Fragment Length Polymorphism and Sequence Analyses of the Internal Transcribed Spacer and Large-Subunit Regions of Ribosomal DNA. J. Clin Microbiol;2004; 42(9):4253-4260
9. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of Malassezia species isolated from Patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. Medical Mycology;2000; 38:337-341.
10. Nell A.Identification and distribution of novel Malassezia species yeast on nor equin skin.Vet.Rev; 2002; 30(158): 395-8.
11. Sandstrom Falk M.H, Tengvall Linder M, Johansson C, Bartsoik J, Back O, Sarnhult T, Wahlgren C.F, Scheynius A, Faergemann J. The prevalence of Malassezia yeasts in patients with Atopic dermatitis, Seborrhoeic dermatitis and Healthy Controls. Acta Derm Venereol; 2005; 85: 17-23.

The Prevalence of Malassezia Yeasts in Healthy Subjects and Patients with SD in Lorestan, Bakhtiari Nomads

Mary Sarlak M. Madani Mohammad Zia

Abstract

Introduction: The genus Malassezia yeasts, yeasts are lipophilic Bazydyvmayst as members of the microbial flora of humans and warm-blooded animals often are. Seborrheic dermatitis is a chronic inflammatory disease of the skin surface is observed in adult men. The aim of this study was to investigate the prevalence of Malassezia in Lorestan, Bakhtiari nomads.

Materials & methods: sampling techniques chip was taken from dandruff head and behind the ears. Sample of 100 subjects (50 healthy subjects and 50 patients with seborrheic dermatitis) and on the Lymyng - Nvtmn agar was modified crops. Macroscopic and microscopic studies were performed on colonies of Malassezia in pure culture.

Results: In this study of yeast cells to the total sample of patients with seborrheic dermatitis in 27 (54%) patients, and 17 patients (34%) showed growth of yeast colonies. In healthy individuals, the total amount of yeast cells in the samples, 24 (48%) patients and 14 (28%) showed growth of yeast colonies.

Conclusion: The findings showed that Malassezia yeasts in 51% of cases and 31% of the direct examination of the cultures were isolated.

Key words: Malassezia, SD, Medium Lymyng - Nvtmn agar Amended, Dandruff