آزمایش مستقیم میکروسکوپی در تعیین مخمر مالاسزیا در شوره سر و تشخیص سریع حالت تهاجمی قارچ: *گزارش کوتاه*

مهدی زارعی، پریوش کردبچه
روشنک داعی‌قزوینی، انسیه زیبافر
محسن گرامی‌شعار
زینب برجیان بروجنی، مهدی ناظری
لیلا حسین‌پور، محمد میر بلوک جلالی
سید جمال هاشمی*

دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن: ۸۸۹۵۱۵۸۳-۰۲۱
E-mail: sjhashemi@tums.ac.ir

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۱

زمینه و هدف: فلور مالاسزیایی تحت شرایطی تکثیر یافته و باعث پوسته‌ریزی (شوره و درماتیت) و ناراحتی جسمی و روانی، به‌خصوص در جوانان می‌شود. لذا، این مطالعه با هدف تشخیص آسان و سریع حالت تکثیری و تهاجمی، جهت درمان به‌موقع انجام شده است.

روش بررسی: نمونه‌گیری از پوست سر داوطلبین انجام و لام مستقیم با رنگ متیلن‌بلو تهیه شد و از نظر مورفولوژی، میزان مخمر و وجود میسلیوم بررسی گردید.

یافته‌ها: از کل ۱۴۰ نمونه، وجود مخمر در ۹۳/۵٪ (۱۳۱) مثبت و ۶/۵٪ (۹) منفی بود که میزان مخمر در حالت خفیف یا نرمال ۲۵/۲٪، متوسط ۲۴/۵٪ و شدید ۵۰/۳٪ گزارش گردید. وجود میسلیوم در بین نمونه‌های مثبت، ۲۲/۹٪ (۳۰) گزارش گردید (P=۰/۰۰۷).

نتیجه‌گیری: به‌کار بردن روش و الگویی ساده، ارزان و در دسترس (الگوی تعیین میزان مخمر با آزمایش مستقیم میکروسکوپی) برای افتراق فلور از حالت غیرطبیعی مخمر مالاسزیا می‌تواند جهت اقدام سریع در پیشگیری و درمان مفید باشد.

کلمات کلیدی: مالاسزیا، شوره، درماتیت سبورورییک، آزمایش مستقیم، میسلیوم.

مقدمه

مالاسزیاها (Malassezia) مخمرهای جوانه‌دار، اغلب لیپوفیل و جزو فلور نرمال پوست بدن انسان و حیوانات خون‌گرم، ازجمله پوست‌سر انسان بوده و تحت شرایط خاصی فرصت‌طلبانه میزان تکثیر آن‌ها افزایش می‌یابد.[۱و۲] شهرت اعضای این جنس اغلب مربوط به بیماری تینهآ ورسیکالر می‌باشد، اما در بیماری‌ها و اختلالاتی هم‌چون فانگمی، بلفاریت، فولیکولیت، شوره‌سر، درماتیت سبورورییک، درماتیت آتوپیک و پسوریازیس نقش دارند.[۳و۴] در شوره‌سر و درماتیت سبورورییک که روی‌هم‌رفته بیش‌از ۵۰٪ انسان‌ها را درگیر می‌نمایند، مخمرها در پوست‌سر، افزایش تکثیر داشته که باعث افزایش پوسته‌ریزی شده و ایجاد ناراحتی جسمی و روانی در افراد می‌نماید.[۵و۶] صرف‌نظر از تعیین هویت گونه مالاسزیا، اقدام اولیه و دارای اهمیت جهت بررسی اختلالات مذکور (شوره‌سر و درماتیت سبورورییک) تشخیص افزایش تکثیر و تهاجم قارچ می‌باشد تا در صورت وجود حالت غیرنرمال، نسبت به جلوگیری و رفع آن اقدام درمانی لازم به‌عمل آید. با توجه به مشکلات کشت این قارچ در محیط‌های کشت متداول قارچ‌شناسی هدف از این مطالعه، به‌کارگیری روشی سریع، ارزان، آسان، قابل‌دسترس و الگویی مناسب در تشخیص و تمایز حالت افزایش تکثیر و تهاجم (میزان مخمر فراوان و تولید میسلیوم) از حالت فلور نرمال می‌باشد که می‌تواند علاوه‌بر تسریع در شروع درمان پیشگیرانه و هم‌چنین درمان بیماری پس‌از ایجادشدن، با حداقل هزینه، سبب بهبود بهداشت جسمی، فردی و روانی افراد شود که در این بین آزمایش مستقیم میکروسکوپی یک

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

روش مناسب جهت استفاده از الگوی تعیین میزان مخمر بوده و از اهمیت خاص و کاربردی برخوردار می‌باشد.[۷]

روش بررسی

در این مطالعه Cross sectional که در آزمایشگاه بخش قارچ‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت، در مدت ده‌ماه بین سال‌های ۹۱-۱۳۹۰، از پوست‌سر ۱۴۰ نفر از افراد بالغ داوطلب همکاری و از هر دو جنس مذکر و مونث، به‌وسیله تراشیدن با اسکالپل نمونه‌گیری به‌عمل آمد. تعداد نمونه براساس شیوع ۹۰٪ وجود مالاسزیا در پوست‌سر بالغین با میزان آلفای ۰/۰۵ (α=۰/۰۵) طبق فرمول برآورد نمونه محاسبه گردید. عدم استحمام افراد در حداقل دو روز قبل‌از نمونه‌گیری از شرایط ورود به مطالعه بود که در زمان اخذ نمونه از افراد سوال و رعایت شد. به علاوه جهت بررسی و ارتباط‌سنجی بین میزان مخمر و سایر فاکتورها و هم‌چنین بین وجود میسلیوم و سایر فاکتورها، پرسش‌نامه‌ای تهیه و در حین نمونه‌گیری، اطلاعات لازم از افراد پرسیده شد و با رضایت آنان ثبت گردید. جهت انجام آزمایش، مقداری از پوسته‌ها روی لام حاوی یک قطره آب مقطر قرار داده شد و لام دیگری به‌صورت صلیبی بر روی پوسته‌های لام اول قرار گرفت و با فشار بر روی هم، دو عدد لام مستقیم تهیه شد. پس‌از خشک و فیکس‌شدن و رنگ‌آمیزی با متیلن‌بلو (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)، به‌وسیله دید مستقیم میکروسکوپ نوری (Olympus, Germany) آزمایش گردیدند. علاوه‌بر بررسی خصوصیات مورفولوژیکی مخمرها با اشکال گرد، بیضوی و کشیده و با جوانه قطبی که وجود مالاسزیاها را در نمونه تایید می‌کرد میزان مخمر نیز از نظر تعداد و هم‌چنین وجود میسلیوم، ارزیابی می‌شد. جهت برآورد میزان مخمر براساس تعداد متوسط مخمر از روش زیر استفاده گردید:[۷] ابتدا متوسط تعداد مخمر در پنج میدان میکروسکوپی با درشت‌نمایی بالا (عدسی ۴۰) High Power Field (HPF) محاسبه شد و نتایج به‌صورت زیر گزارش گردید: موارد عدم مشاهده مخمر به‌عنوان منفی، کم‌تر از پنج مخمر به‌عنوان کلنیزاسیون خفیف و فلور نرمال، بین ۱۵-۵ به‌عنوان کلنیزاسیون متوسط و بیش‌تر از ۱۵ مخمر به‌عنوان کلنیزاسیون شدید و حالت تکثیریافته و بیماری محسوب گردید. مشاهده میسلیوم در نمونه‌ها نیز بیان‌گر وضعیت تهاجمی قارچ بود که نتایج آن‌ها ثبت گردید.[۱] جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ استفاده شد. جهت بررسی دخالت عوامل مختلف در ایجاد میسلیوم، آزمون‌های آماری χ^2 و Fisher's exact test برای یافتن رابطه آماری به‌عمل آمد.

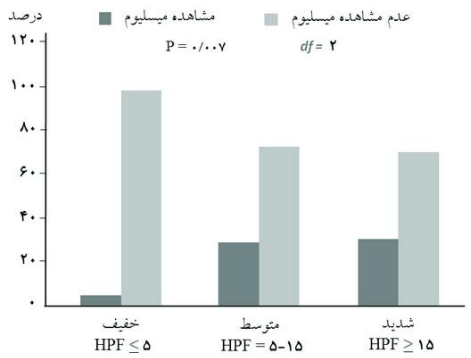
یافته‌ها

میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۲۷/۲ سال (SD=۱۲/۳) بود (۸۰-۱۱ سال) و ۵۹/۵٪ افراد مذکر (مرد) و ۴۰/۵٪ افراد مونث (زن) بودند و بیش‌ترین درصد افراد نیز در گروه سنی ۳۰-۲۱ سال قرار داشت. نتیجه کلی وجود مخمر در مجموع هر دو جنس و گروه‌های

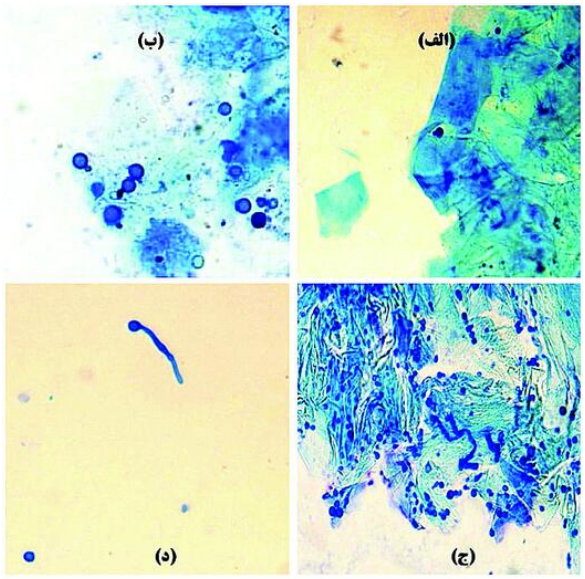
جدول ۱: میزان مخمر مالاسزیا و مشاهده میسلیوم در پوست‌سر، براساس فواصل استحمام به‌تفکیک

بررسی رابطه بین میزان مخمر با فاکتور فواصل استحمام					بررسی رابطه بین مشاهده میسلیوم با فاکتور فواصل استحمام			
میزان مخمر	خفیف	متوسط	شدید	مجموع	میسلیوم	مشاهده میسلیوم	عدم مشاهده میسلیوم	مجموع
متغیر	Hpf≤ ۵	Hpf= ۵-۱۵	Hpf≥ ۱۵		متغیر			
۲-۱ روز	۷(٪۱۴/۷)	۱۷(٪۴۴/۱)	۱۶(٪۴۱/۲)	۴۰(٪۱۰۰)	**۲-۱ روز**	۹(٪۲۲/۵)	۳۱(٪۷۷/۵)	۴۰(٪۱۰۰)
۴-۳ روز	۲۱(٪۲۷/۷)	۱۳(٪۱۸/۵)	۳۷(٪۵۳/۸)	۷۱(٪۱۰۰)	**۴-۳ روز**	۱۷(٪۲۳/۹)	۵۴(٪۷۶/۱)	۷۱(٪۱۰۰)
۵ < روز	۵(٪۲۱/۴)	۲(٪۷/۱)	۱۳(٪۷۱/۴)	۲۰(٪۱۰۰)	**۵ < روز**	۴(٪۲۰)	۱۶(٪۸۰)	۲۰(٪۱۰۰)
مجموع	۳۳(٪۲۵/۲)	۳۲(٪۲۴/۵)	۶۶(٪۵۰/۳)	۱۳۱(٪۱۰۰)	**مجموع**	۳۰(٪۲۲/۹)	۱۰۱(٪۷۷/۱)	۱۳۱(٪۱۰۰)
	df=۴ P=۰/۰۲					df=۲	P=۰/۸	

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]



نمودار ۱: مشاهده میسلیوم براساس میزان مخمر مالاسزیا در پوست‌سر



شکل ۱: مشاهده میسلیوم در آزمایش مستقیم و بررسی میزان مخمر با حالت‌های خفیف، متوسط، شدید: الف- میزان مخمر خفیف (کم‌تر از ۵ عدد)، ب- میزان مخمر متوسط (۱۵-۵ عدد)، ج- میـــزان مخمر شدید (بیش‌تر از ۱۵ عدد) به‌همراه مشـاهده میسلیوم، د- مخمر را در حالت تولید هایف یا میسلیوم نشان می‌دهد.

سنی مختلف به‌ترتیب عبارت بودند از: تعداد ۹۳/۵٪ (۱۳۱ نمونه) مثبت و ۶/۵٪ (۹ نمونه) منفی. در بین موارد مثبت، میزان مخمر در حالت خفیف یا نرمال ۲۵/۲٪، متوسط ۲۴/۵٪ و شدید ۵۰/۳٪ گزارش گردید. هم‌چنین وجود میسلیوم (حالت تهاجمی) که اغلب توسط دو گونه مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا فورفور تولید می‌شود،[۱] در بین نمونه‌های مثبت، ۲۲/۹٪ (۳۰ نمونه) گزارش گردید. بین میزان مخمر و فواصل استحمام رابطه معنی‌داری مشاهده گردید (P=۰/۰۲)، اما بین مشاهده میسلیوم و فواصل استحمام رابطه معنی‌داری مشـــاهده نشد (P=۰/۸) (جدول ۱). در عین حال، بین مشاهده میسلیوم و میزان مخمر رابطه معنی‌دار آماری وجود نداشت (P=۰/۰۰۷) (نمودار ۱).

بحث

تشخیص و شناسایی مالاسزیاها در سطح جنس، توسط خصوصیات مورفولوژیکی منحصربه‌فرد آنان که دارای جوانه تک‌قطبی و اسکار مشخص بوده، امکان‌پذیر می‌باشد. در بررسی‌های مختلف نتایج آزمایش مستقیم پوسته‌های مرتبط با مالاسزیا بسیار متغیر بوده و بین ۳۳/۳ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است.[۸و۹] در این مطالعات عنوان شده که با استفاده از روش نمونه‌گیری مناسب، می‌توان مشاهده و جداسازی مالاسزیا را از سطح پوست‌سر افزایش داد.[۱۰] جهت نمونه‌برداری از روش‌های مختلفی هم‌چون تراشیدن، نوارچسب اسکاچ، سواپ و برس‌مو استفاده شده است[۱۱] که در این مطالعه نیـز با استفاده از روش تراشیـدن که روش منـاسبی بوده و بـه علاوه، به‌دلیل برداشت مقدار زیاد نمونه، شانس مشاهده مخمر را افزایش می‌دهد، نمونه‌گیری به‌عمل آمد و نتیجه آزمایش مستقیم در ۹۳/۵٪ موارد مثبت گردید. در مطالعه حاضر، در آزمایش مستـقیم که با رنگ‌آمیزی متیلن‌بلو به‌عمل آمد، در ۲۲/۹٪ موارد، علاوه‌بر اشکال مخمری، هایف نیز مشاهده گردید (شکل ۱) که حالت تهاجمی قارچ را مطرح کرده و اغلب توسط دو گونه مالاسزیا گلوبوزا و مالاسزیا فورفور ایجاد می‌شود و علامتی جهت تسریع در شروع درمان محسوب می‌شود.[۱]

بین مشاهده میسلیوم و میزان مخمر رابطه معنی‌دار آماری مشاهده گردید (P=۰/۰۰۷) که گویای این مطلب است که در موارد شدید تکثیر مخمر (متوسط بیش‌تر از ۱۵ عدد مخمر در پنج میدان میکروسکوپی hpf)، زمینه لازم جهت رشد قارچ فراهم بوده و این شرایط باعث رشد میسلیومی گونه‌های دارای قابلیت تهاجم شده است که خصلت‌های تهاجمی گونه‌های موجود را نیز تبیین می‌نماید (نمودار ۱). در لام مستقیم، سنجش میزان مخمر نیز بررسی شد و بر پایه الگوی بیان‌شده در بخش روش‌بررسی، براساس سه درجه خفیف

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

یا طبیعی، متوسط و شدید گزارش و طبقه‌بندی گردید (شکل ۱)؛ ارتباط این درجات به‌عنوان میزان مخمر، با سایر فاکتورهایی که احتمال دخیل بودن آن‌ها داده می‌شد، محاسبه گردید و رابطه‌های معنی‌دار بین میزان مخمر و فواصل استحمام مشاهده شد (P=۰/۰۲). سطح بهداشت فردی در میزان تکثیر مخمر موثر بوده و افزایش فواصل استحمام باعث چرب‌شدن پوست و ایجاد شرایط مناسب جهت افزایش میزان تکثیر مخمر می‌گردد[۱و۱۲] که در مطالعه حاضر نیز این موضوع تایید شد. نکته قابل‌توجه این‌که، با وجود افزایش میزان مخمر در طولانی‌شدن فواصل استحمام، هیچ رابطه معنی‌داری بین طولانی‌شدن این مدت و مشاهده میسلیوم مشاهده نشد (P=۰/۸) که بیان‌گر این مطلب است که مشاهده میسلیوم بیش‌تر به خصوصیات تهاجمی گونه‌های تولیدکننده میسلیوم (اغلب دو گونه مالاسزیا گلوبوزا و فورفور) مرتبط می‌باشد و سطح بهداشت فردی به‌احتمال، تأثیر کم‌تری در ایجاد اولیه میسلیوم دارد.

بدیهی است که محیط چرب حاوی ترشحات سبوم، شرایط بهتری را برای رشد بیش‌تر میسلیوم‌های ایجادشده فراهم می‌کند که سنجش میزان میسلیوم ایجادشده، بیان‌گر قطعی این مطلب خواهد بود که محیط پرچرب حاوی ترشحات سبوم، به‌تنهایی ایجادکننده میسلیوم نبوده، ولی توسعه‌دهنده میسلیوم‌ها و افزایش‌دهنده رشد آن‌ها خواهد بود (جدول ۱). بنابراین با به‌کارگیری یک روش ساده، ارزان و قابل دسترسی مثل آزمایش مستقیم میکروسکوپی و بااستفاده از الگوی میزان مخمر (بخش روش بررسی) می‌توان در کم‌ترین زمان، مرز بین فلور قارچی پوست‌سر را از حالت تکثیریافته بیش‌از حد و حالت تهاجمی (تولید میسلیوم) قارچ که می‌تواند به‌عنوان حالت پاتولوژیک مطرح شده و در بیماری‌هایی مثل درماتیت سبورویک، درماتیت آتوپیک، پسوریازیس و شوره‌سر مشاهده می‌شود و نیاز به‌درمان دارویی دارد، تشخیص داد.

به‌علاوه، در مواردی‌که پوسته‌ریزی سر، به‌دلایلی غیر از دخالت عوامل قارچی بوده و میزان مخمر پوست‌سر در آن‌ها بیش‌از حد نبوده و هم‌چنین حالت تهاجمی نیز مشاهده نمی‌شود و نیاز به درمان ضدقارچی ندارد، از درمان بی‌مورد با داروی ضدقارچ و بدون تشخیص آزمایشگاهی که دارای عوارض جانبی و تبعات ناشی‌از مقاومت دارویی در اثر در معرض قرارگرفتن قارچ در برابر دارو می‌باشد، جلوگیری نمود که این مسئله صرفه‌های اقتصادی و زمانی و سلامت جسمی و روانی را برای افراد و جامعه در پی خواهد داشت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تعیین هویت مالاسزیاهای موجود در پوست سر با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک و الگوی توئین" در مقطع کارشناسی‌ارشد در سال ۱۳۹۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

References

1. Zaini F, Mahbod ASA, Emami M. Comprehensive Medical Mycology. 3rd ed. Tehran: Tehran University Publications; 2009. [Persian]
2. Shokohi T, Hajheydari Z, Barzgar A, Hashemi Sooteh MB, Hedayati MT, Aghili SR, 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.
3. Marcon MJ, Powell DA. Human infections due to Malassezia spp. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(2):101-19.
4. Midgley G, Gueho E, Guillot J. Disease caused by Malassezia species. In: Ajello L, Hay RJ, editors. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. London: Arnold; 1998. p. 201-11.
5. Grimalt R. A practical guide to scalp disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007;12(2):10-4.
6. Dawson TL Jr. 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(2):15-9.
7. Conti Diaz IA, Civila E, Veiga R. The importance of microscopic examination in the management of desquamative diseases of the scalp. *Mycopathologia* 2002;153(2):71-5.
8. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, Faergemann J. Quantitative culture of Malassezia species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol* 2001;39(3):243-51.
9. McGinley KJ, Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff, and seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1975;64(6):401-5.
10. Tarazooie B. Isolation and identification of Malassezia species in skin lesions and healthy individuals .Tehran University of Medical Sciences, Health faculty, MSc Thesis, 1994. [Persian]
11. Gupta AK, Kohli Y. Prevalence of Malassezia species on various body sites in clinically healthy subjects representing different age groups. *Med Mycol* 2004;42(1):35-42.
12. Mayser P, Pickel M, Haze P, Erdmann F, Papavassilis C, Schmidt R. Different utilization of neutral lipids by Malassezia furfur and Malassezia sympodialis. *Med Mycol* 1998;36(1):7-14

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

TUMJ Tehran University Medical Journal, August 2013; Vol. 71, No. 5: 345-349 Brief Report

Microscopic examination in quantifying of *Malassezia* yeast in scalp and rapid diagnosis of fungi invasive condition: *a brief report*

Mahdi Zareei Student of Ph.D.
Parivash Kordbacheh Ph.D.
Roshanak Daie Ghazvini Ph.D.
Ensieh Zibafar Ph.D.
Mohsen Geramishoar M.Sc.
Zeinab Borjian Borujeni B.Sc.
Mehdi Nazeri Student of Ph.D.
Leila Hossein Pour B.Sc.
Mohammad Mirbulook Jalaly B.Sc.
Seyed Jamal Hashemi Ph.D.*

Department of Medical Mycology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Food Microbiology Research center, Tehran University of Medical Sciences, Ghods St., Poursina St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88951583
E-mail: sjhashemi@tums.ac.ir

Abstract

Received: December 11, 2012 Accepted: January 30, 2013

Background: *Malassezia* Species are often commensal of the human skin and scalp that opportunistically in exist of particular predisposing factors, their proliferation increases; as, in dandruff and seborrheic dermatitis which both togather affect more than 50% of humans, the excess proliferation of yeast in scalp, leads to scalp-flaking and causes physical and mental disorder in peaple, spacially in youth that their health and hiar hygiene and beauty is more important for them. Thus, this survey has been done for rapid, easy and inexpensive method to diagnosis of abnormal proliferation and invasive condition of *Malassezia* yeast and can be more benefical for proper treatment.

Methods: Sampling with scalpel scraping from scalp of volunteer persons that had not bathed at least two day ago were done and preparation of direct microscopic slides and staining with methylene blue were accomplished. Then, survey of morpholgic characteristics, yeast quantification and mycelium detection were done by direct microscopic examination.

Results: From 140 scalp samples of adult persons of both gender (male and female) with different age groups, observation of *malassezia* yeast in 93.5% (131) were positive and 6.5% (9) were negative in direct microscopic examination. Results of yeast quantification in positive cases were: mild or normal flora 25.2%, intermediate 24.5%, severe 50.3%. Detection of mycelium in positive cases were 22.9% (30) (P=0.007 df=2).

Conclusion: Application of an accessible, easy and inexpensive method and a determinated pattern (yeast quantification with direct microscopic examination) to distinguish normal flora from abnormal condition (excess proliferation and mycelium production) in cases of *Malassezia* yeasts can be more useful to rapid diagnosis of abnormal proliferation and invasive condition in order to initiate a proper antifungal treatment.

Keyword: Dandruff, direct examination, *Malassezia*, mycelium, seborrhic dermatitis.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]