

# Atopik Dermatitli Hastalarda *Malassezia* Yükünün Moleküler Yöntemler ile Gösterilmesi

## *Molecular Analysis of Malassezia Load in Patients with Atopic Dermatitis*

Meltem Önder, Ayşe Kalkancı\* Canan Kevlekçi, Mehmet Ali Gürer, Takashi Sugita\*\*

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı ve \*Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

\*\*Meiji Eczacılık Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü, Kiyose, Tokyo, Japonya

### Özet

**Amaç:** Atopik dermatit (AD) etyolojisinde ve hastalık alevlenmesinde *Malassezia* cinsi mayaların rolü olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada atopik dermatitli hastalarda derideki *Malassezia* yükünü göstermek için geliştirilen, kültürden bağımsız bir moleküler yöntem sunulmaktadır.

**Gereç ve Yöntem:** Üç farklı (hafif, orta, ciddi) klinik evredeki atopik dermatitli hastaların *Malassezia* kolonizasyon oranları, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR) kullanılarak incelenmiştir. Kırk-yedi (47) atopik dermatitli hasta, ve 75 erişkin sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların ve sağlıklı grubun yüz ve boyunda lezyon olan ve olmayan bölgelerinden deri kepek örnekleri flastere yapıştırılarak alınmıştır. Flastere yapışan kepek örneklerinden fungal DNA izole edilmiş ve *Malassezia* DNA'sının gösterilmesi için GZ-PZR işlemine alınmıştır.

**Bulgular:** Olgu sayısı 47 hasta, 75 sağlıklı birey olmak üzere (62 kadın, 60 erkek) 122'dir. Kantitatif analizlere göre *Malassezia* kolonizasyonu AD ve sağlıklı grup arasında farklı bulunmamıştır. Ciddi AD'li olan grup ile orta veya hafif AD'li olan gruplar arasında *Malassezia* yükü açısından bir fark gösterilememiştir (p=0,409).

**Sonuç:** Çalışmamızın başında, daha önceki Japon çalışmalarında gösterilen *Malassezia* yükü ile AD arasındaki ilişkiyi bulmayı amaçlamamıza rağmen, çalışma sonunda Türk AD grubunda sağlıklı gruptan farklı bir fungal yük bulunmamıştır. Ancak, deri hastalıklarının patogeneğinde mikroorganizmaların rolü konusunda çalışmalara devam edilmelidir. (Türkderm 2011; 45: 206-9)

**Anahtar Kelimeler:** *Malassezia*, atopik dermatit, klinik evre, gerçek zamanlı PZR, kantitasyon

### Summary

**Background and Design:** Atopic dermatitis (AD) is a multifactorial disease in which *Malassezia* species are also considered to be one of the factors that exacerbate AD. We have developed a culture-independent method for analyzing cutaneous *Malassezia* load in patients with atopic dermatitis.

**Materials and Methods:** The diversity of *Malassezia* flora in Turkish patients with atopic dermatitis of three different clinical severities (mild, moderate, and severe) were compared using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) method. Forty-seven individuals with AD and seventy-five adult healthy individuals were sampled in this study. Skin samples were collected by stripping the face and neck of each subject. Fungal DNA extraction was performed and the detection of *Malassezia* DNA by real-time PCR was conducted.

**Results:** Total number of patients was 122, including 47 patients and 72 healthy controls (62 female, 60 male). Quantitative analysis of *Malassezia* colonization in the AD group and healthy control group was not significantly different between the AD and healthy control groups. In patients with severe AD, *Malassezia* colonization was not different that in mild and moderate AD patients and healthy individuals, and the differences among them were not statistically significant (p=0.409).

**Conclusion:** We could not find any difference in our patient group in terms of *Malassezia* colonization rate, although we had hypothesized. We could not show a fungal factor for the severity of the disease in AD patients. Japanese authors showed such a kind of relationship in the past. Besides, skin diseases should be evaluated carefully for the presence of microorganisms as an important factor of pathogenesis of the disease. (Türkderm 2011; 45: 206-9)

**Key Words:** *Malassezia*, atopic dermatitis, clinical severity, real-time PCR, quantitation

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
E-posta: aysekalkanci@email.com **Geliş Tarihi/Received:** 02.02.2011 **Kabul Tarihi/Accepted:** 14.04.2011

Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.  
Türkderm-Archives of the Turkish Dermatology and Venerology, published by Galenos Publishing.

## Giriş

Atopik dermatit (AD) sık görülen, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalık genel olarak yaşamın ilk iki yılında başlar ve her üç olgudan ikisi erişkin dönemde de devam eder. AD genetik ve çevresel faktörlerin de etkili olduğu, çok faktörlü bir hastalıktır. AD'li olan hastalar bazı bakteriyel, fungal ve viral hastalıklara daha duyarlıdır. Yaşamın erken dönemlerinde mikrobiyal antijenler ile yeterince karşılaşmamış bireylerde hastalık riski artmaktadır. AD'li bireylerde antimikrobiyal peptidlerin azalması, yardımcı T hücrelerin Th2 tipindeki sitokinleri (IL-4, IL-10 gibi) daha baskın olarak salgılamaları ile açıklanabilir. Deri yüzeyindeki bağışıklık sisteminin bozulması özellikle *Staphylococcus aureus* and *Malassezia* kolonizasyonunun artmasına neden olmaktadır.<sup>1,2,3</sup> *Malassezia* (eskiden *Pityrosporum orbiculare/ovale* olarak bilinmekteydi) derinin normal florasının bir elemanı olup, aynı zamanda "pityriasis versicolor (PV)", *Malassezia* follikülüti, seboreik dermatit, kepeklenme ve AD gibi bazı hastalıkların da patogenezinde etkilidir.<sup>3,4</sup> Bu çalışmada, AD'li hastaların derisinde *Malassezia* yükünü araştırmak için geliştirdiğimiz, kültürden bağımsız bir moleküler yöntem sunulmaktadır. Üç farklı klinik tablo gösteren AD hasta grubunda, (ciddi, orta ve hafif seyirli hastalık) *Malassezia* yükü ile bir ilişki olup olmadığı kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kGZ-PZR) yöntemi ile incelenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### Hastalar

Erişkin yaş grubundan AD'li 47 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak, yaş grubu benzer 75 sağlıklı bireyden deri örnekleri alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması 36±15 olarak hesaplanmıştır. Toplam 122 hastanın 62'si kadın ve 60'ı erkektir. Bütün hastalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı polikliniklerinde takip edilmiş ve Hanifin ve Rajka kriterlerine göre AD tanısı almıştır.<sup>5</sup> Bütün çalışma Helsinki Bildirisi'ne uygun etik kurul onayı altında devam ettirilmiştir. Hastaların tamamından "bilgilendirilmiş gönüllü olur formu" alınmıştır. Deri örnekleri yurtdışı'na gönderildiği için ayrıca bu konuda da Sağlık bakanlığından izin alınmıştır.

### Örnek toplanması

Örnek alımı için "OpSite™ (3x7 cm; Smith and Nephew Medical, Hull, UK)" hastanın yüz ve boyundaki lezyonlu veya lezyonsuz deri bölgesine yapıştırılmış ve çekilmiştir. Deri örneklerini içeren "OpSite" -20°C'de saklanmıştır.

### DNA eldesi ve çoğaltılması

Toplanan "OpSite" yüzeyleri Gazi Üniversitesi, Mikrobiyoloji Bölümü'ne gönderilmiştir. Örnekler parçalama tamponu [(100 mmol/L) Tris-HCl (pH 8,0, 30 mmol/L) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8,0, %0,5 sodium dodecyl sulphate (SDS)] içinde 100°C'de 15 dk bekletilmiştir. Karışımdan DNA eldesi için fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1,vv) ve kloroform-izoamil alkol (24:1,vv), kullanılmıştır. Elde edilen DNA etanol-sodyum asetat-Ethatinmate (Nippon Gene, Toyama, Japan) ile çöktürülmüştür. DNA çökeleği 30 µL TE tamponu [(10 mmol/L) Tris-HCl (pH 8,0, 1 mmol/L) EDTA (pH 8,0)] ile tekrar sulandırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.<sup>6,7</sup>

### *Malassezia*'nın kantitatif analizi

*Malassezia* DNA'sının GZ-PZR ile kantitatif olarak çoğaltılması için daha önceden belirlenmiş iki çift primer seti ve bir adet işaretli prob

kullanılmıştır. (Mala-F- CTA AAT ATC GGG GAG AGA CCG A, Mala-R- GTA CTT TTA ACT CTC TTT CCA CCG TGC TT, Mala prob FAM-TTC ATC TTT CCC TCA CGG TAC-MGB) kullanılmıştır.<sup>6,7</sup> Cinsine özgül primerler ribozomal RNA gen bölgesinin internal transcribed spacer 1 (ITS1) ve IGS 1 bölgelerini çoğaltmak üzere tasarlanmıştır. Fungal DNA TaqMan prob kullanılarak gerçek zamanlı PZR cihazında kantitatif olarak çoğaltılmıştır.<sup>7</sup> Çoğaltma ve gösterme için ABI PRISM 7500 sistemi kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### İstatistiksel analiz

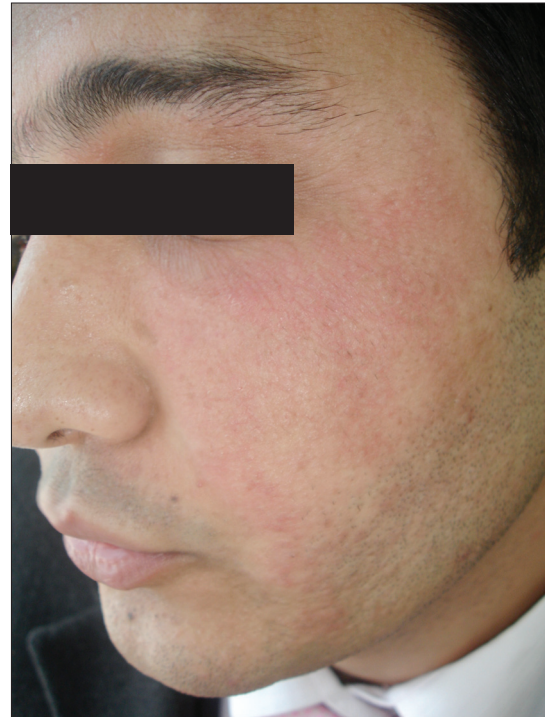
*Malassezia* DNA kopya sayıları ile gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek için Fischer kesin testi kullanılmıştır. İki grup arasında p<0,05 bulunduğunda fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## Bulgular

Çalışma kapsamında 47 AD hastası ile 75 sağlıklı kontrolden alınan deri örneklerinde *Malassezia* yükü araştırılmıştır. AD grubunda 9 hasta hafif, 26 hasta orta, 12 hasta da ciddi AD olarak sınıflandırılmıştır. *Malassezia* yükünün kantitatif analizi için alt sınır 10 kopya/ml olarak belirlenmiştir. Yükü bilinmeyen örneklerin kopya sayıları plazmid kopya sayıları esas alınarak hesaplanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ile AD grubu arasında *Malassezia* yükü açısından bir fark gösterilmemiştir (t=0,962, 2-tailed=0,341). Ciddi AD'li hasta grubu ile orta veya hafif seyirli grup arasında da *Malassezia* yükü açısından bir fark gösterilememiştir (p=0,409). Tablo'da hastalardan elde edilen bütün fungal yükler listelenmiştir.

## Tartışma

*Malassezia* cinsi mayalar normal deri florasının bir üyesi olup, aynı zamanda birçok deri hastalığının patogenezinde yer almaktadırlar.<sup>3,4</sup> Deri yüzeyindeki *Malassezia* kolonizasyonunun gösterilmesi için çeşit-



Resim 1. Atopik dermatitli bir hastanın yüz lezyonları

Tablo : Atopik dermatitli 47 olgunun *Malassezia* yükleri

	Anatomik bölge	Klinik	<i>Malassezia</i> yükü (DNA kopya sayısı)
1	Lezyon/yüz	Orta	467438
2	Lezyon/boyun	Orta	507053
3	Lezyon yok/yüz	Orta	512858
4	Lezyon/yüz	Orta	76451
5	Lezyon/boyun	Orta	320922
6	Lezyon/yüz	Orta	124386
7	Lezyon/boyun	Orta	244618
8	Lezyon yok/boyun	Orta	87123
9	Lezyon/yüz	Hafif	220427
10	Lezyon/boyun	Hafif	1100000
11	Lezyon yok/boyun	Hafif	65475
12	Lezyon/yüz	Orta	3380000
13	Lezyon/boyun	Orta	2610000
14	Lezyon yok/boyun	Orta	265384
15	Lezyon/yüz	Ciddi	285142
16	Lezyon/boyun	Ciddi	512323
17	Lezyon yok/yüz	Ciddi	83203
18	Lezyon/yüz	Orta	750303
19	Lezyon/yüz	Orta	1150000
20	Lezyon yok/boyun	Orta	94125
21	Lezyon/yüz	Hafif	27800000
22	Lezyon/boyun	Hafif	3860000
23	Lezyon yok/boyun	Hafif	165218
24	Lezyon/yüz	Ciddi	50007
25	Lezyon/boyun	Ciddi	52667
26	Lezyon yok/yüz	Ciddi	68572
27	Lezyon/yüz	Orta	3090000
28	Lezyon/boyun	Orta	1910000
29	Lezyon yok/boyun	Orta	222873
30	Lezyon/yüz	Orta	616224
31	Lezyon/boyun	Orta	586765
32	Lezyon yok/boyun	Orta	818675
33	Lezyon/yüz	Orta	175181
34	Lezyon/boyun	Orta	252335
35	Lezyon yok/yüz	Orta	78943
36	Lezyon/yüz	Ciddi	3050000
37	Lezyon/boyun	Ciddi	198050
38	Lezyon yok/boyun	Ciddi	149718
39	Lezyon/yüz	Ciddi	1060000
40	Lezyon/boyun	Ciddi	341440
41	Lezyon yok/boyun	Ciddi	146774
42	Lezyon/yüz	Hafif	264216
43	Lezyon/boyun	Hafif	180413
44	Lezyon yok/yüz	Hafif	320750
45	Lezyon/yüz	Orta	291116
46	Lezyon/boyun	Orta	2460000
47	Lezyon yok/boyun	Orta	165634

li yöntemler geliştirilmiştir.<sup>8,9</sup> Bu yöntemlerden en etkili olanı yapışkan film kullanarak deri yüzeyinden örnek alınması ve filmin yüzeyine yapışan *Malassezia* hücrelerinin kantitatif olarak sayılmasıdır.<sup>10</sup>

AD'li hastaların deri örneklerinde *Malassezia* kolonizasyonunun kantitatif olarak gösterilmesi için, örnek alınmasından başlayarak, DNA eldesi, DNA çoğaltılma basamağı olmak üzere bütün aşamalarda kalite kontrolüne dikkat edilmiştir. Örnek alma aşamasında yapışkan film yönteminin seçilmesinin nedeni, filmin deri yüzeyine bütünüyle yapışması ve kazıntı örneklerine göre daha yaygın örnek alınmasına imkan vermesindedir.<sup>6</sup>

Çalışmamızda AD ve sağlıklı kişilerin deri örneklerinde *Malassezia* cinsine ait DNA araştırılmıştır. AD'in klinik seyri ile fungal yük arasında bir ilişki gösterilmemiştir. Bu çalışmanın başlangıç hipotezi "AD'li hastalarda *Malassezia* kolonizasyonu daha fazladır" olmasına rağmen, gruplar arasında fungal yük açısından bir fark gösterilememiştir. Benzer çalışmalarda, AD'li hastaların *Malassezia* ile kolonize olma oranlarının sağlıklı kişilerden ve seboreik dermatitli olgulardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir.<sup>11-13</sup> AD'li hastaların derisi nötral pH'da olduğu için *Malassezia* gibi mayaların yerleşmesini kolaylaştırmaktadır.<sup>14</sup>

Yüz ve boyun bölgelerinde AD bulunan hastaların, lezyon bölgelerinde *Malassezia* kolonizasyonunun fazla olduğu, ve bu kişilerin *Malassezia* için özgül IgE antikorları taşıdıkları gösterilmiştir. AD hastalarında diğer mantarlardan çok daha fazla *Malassezia* için gelişmiş Tip 1 aşırı duyarlılık tablosu bulunmaktadır.<sup>8,9</sup> AD patogenezi karmaşık bağışıklık mekanizmalarını içermekte olup, tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Sugita ve ark. AD'li hastalarda kolonize olduğu gösterilen yeni bir *Malassezia* türünü isimlendirmişlerdir.<sup>15-17</sup> Bu araştırmacı grubunun, derinin mikrobiyal bileşenleri ile ilgili çok sayıda yayınlanmış çalışmaları bulunmaktadır.<sup>18</sup> Sugita ve ark. AD grubunda 9 ayrı *Malassezia* türü ile kolonizasyonun söz konusu olduğunu, bazı olguların 3-4 ayrı tür ile kolonize olduklarını göstermişlerdir. *Malassezia* hücreleri erkeklerde 16-18 yaşına kadar, kızlarda 10-12 yaşına kadar artmakta, sonra giderek azalmaktadır. Japonya'da yapılan bu çalışmalarda AD olgularında *Malassezia* yükünün sağlıklılardan çok fazla olduğu gösterilmiştir.<sup>10-13</sup> Fakat bu bulgular bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz Türk hastalar ile doğrulanmamıştır. Bu birbirinden farklı iki sonuç derideki *Malassezia* kolonizasyonunun coğrafik ve etnik faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir. Ayrıca kullanılan yöntemle bağlı farklılıkların da sonuçları etkileyebileceği bilinmelidir. *Malassezia* cinsi mayaların deri hastalıklarının patogenezindeki rollerinin tam olarak anlaşılabilmesi için, farklı etnik gruplardan seçilmiş hastaların yer alışı, standardize edilmiş kantitatif yöntemlerin kullanıldığı geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Deri hastalıklarının patogenezinde rol alan mikroorganizmaların incelenmesi bu hastalıkların tedavisinde yeni seçeneklerin oluşturulmasında yararlı olacaktır.

## Kaynaklar

1. Faergemann J: Atopic dermatitis and fungi. Clin Microbiol Rev 2002;15:545-63.
2. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr: Skin diseases associated with *Malassezia* species. J Am Acad Dermatol 2004;51:785-98.
3. Ashbee HR: Update on the genus *Malassezia*. Med Mycol 2007;45:287-303.
4. Ertam İ, Aytimur D: *Malassezia* spp. ve dermatolojideki yeri. Türkdern 2006;40:7-10.
5. Hanifin JM, Rajka G: Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol 1980;92:4-47.
6. Sugita T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Shinoda T, et al: Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. J Clin Microbiol 2001;39:3486-90.

7. Sugita T, Tajima M, Tsubuku H, Tsuboi R, Nishikawa A: Quantitative analysis of cutaneous *Malassezia* in atopic dermatitis patients using real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2006;50:549-52.
8. Bayrou O, Pecquet C, Flahault A, Artigou C, Abuaf N, Leynadier F: Head and neck atopic dermatitis and *Malassezia* furfur-specific IgE antibodies. *Dermatology* 2005;211:107-13.
9. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A: Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight *Malassezia* species in sera of patients with atopic dermatitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol* 2006;50:851-6.
10. Kaga M, Sugita T, Nishikawa A, Wada Y, Hiruma M, Ikeda S: Molecular analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota from the skin of patients with atopic dermatitis of different severities. *Mycoses (Baskıda)*.
11. Takahata Y, Sugita T, Kato H, Nishikawa A, Hiruma M, Muto M: Cutaneous *Malassezia* flora in atopic dermatitis differs between adults and children. *Br J Dermatol* 2007;157:1178-82.
12. Sugita T, Suzuki M, Goto S, Nishikawa A, Hiruma M, Yamazaki T, et al: Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med Mycol* 2010;48:229-33.
13. Sugita T, Tajima M, Amaya M, Tsuboi R, Nishikawa A: Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004;48:755-9.
14. Howell MD: The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:413-7.
15. Sugita T, Tajima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R: New yeast species, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004;48:579-83.
16. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A: Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003;41:4695-9.
17. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R et al: New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:1363-7.
18. Sugita T, Kodama M, Saito M, Ito T, Kato Y, Tsuboi R et al: Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2003;41:3022-7.