السورية العربية الجمهورية

جـامـعـــــة دمشق

كليــة: الطب البشري

قـسم: الطب المخبري

دراسة حساسية تلون غرام في الكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة

study the Sensitivity of Gram staining in Detection of Malassezia the causative agent of Pityriasis Versicolor

بحث علمي أعد لنيل شهادة الماجستير في الطب المخبري

بإشراف : أ.م.د آمال عساف **برئاسة : أ.د عبير الكفري**

إعداد طالبة الدراسات العليا :سلوى حسن العبدالله

2019 .2020

مخطط البحث

أولا : الدراسة النظرية : (5-29)

1-التاريخ الزمني للملاسيزيا.....5

2- أهم الأمراض التي تسببها الملاسيزيا 6

3-مقدمة عن النخالية المبرقشة.....8

4- أسباب النخالية المبرقشة 8

5- الوبائيات والانتشار 8

6- العوامل المؤهبة للإصابة بالنخالية المبرقشة 9

7- الآلية الإمراضية لخمائر الملاسيزيا 10

8- العوامل المساعدة على إزمان الإصابة بالنخالية المبرقشة 11

9- أماكن توضع الآفات 13

10- التظاهرات السريرية للنخالية المبرقشة 14

11- التشخيص التفريقي للنخالية المبرقشة 16

12- الاستقصاءات وطرق التشخيص 17

13- تلوين غرام.....21

13-1 مبدأ تلوين غرام 21

13-2 مكونات تلوين غرام 22

13-3 مصادر الخطأ في تلوين غرام 22

13-4 نتائج تلوين غرام 23

13-5 تفسير نتائج تلوين غرام 23

6-13 تفسير التلوين إيجابي الغرام لخمائر الملاسيزيا 24
14- سير المرض والإنذار 25
15- علاج النخالية المبرقشة 25

ثانيا : الدراسة العملية : (29-74)

1-أهمية البحث 29

2- هدف البحث 29

3- المواد والطرائق 30

4- النتائج والتحليل الإحصائي 43

5- المقارنة مع دراسات أخرى 68

6- الملخص والمناقشة 71

7- التوصيات 74

8- المقترحات 74

9- المراجع 75

أولا :الدراسة النظرية:

1- التاريخ الزمني للملاسيزيا :

خلال فترة 160 عام من التقدم العلمي تم اكتشاف العديد من الأنواع الفطرية تبعاً لمعايير شكلية وفيزيولوجية خاصة.[2,1]

في عام 1846 لاحظ العالم ***Eichsted*** وجود أشكال خمائرية وخيطية معاً في الوسوف المأخوذة من آفات النخالية المبرقشة، وتلى ذلك بعد 150 سنة اكتشاف الملاسيزيا الفرفرية والتي كانت تعرف ســابقاً (بالوبيغاء البيضوية ***Pityrosporum Ovale*** والوبيغاء الدويرية ***Pityrosporum Orbiculare***)

كعامل مسبب للنخالية المبرقشة.

تضم الفلورا الطبيعية في الجلد عدداً من الخمائر الفطرية المميزة المحبة للدسم، وسميت سابقاً بخمائر الوبيغاء لكن الآن لا يعتمد على تصنيف تلك الخمائر ضمن جنس الوبيغاء، وإنما تم تصنيفها ضمن جنس الملاسيزيا .

تم تحديد ومعرفة أربعة عشر نوعاً من الملاسيزيا[3]، إذ تم تحديد أغلبها باستخدام التقنيات البيولوجية الجزيئية، وتبين بعدها أن ثمانية أنواع تصيب الجلد البشري بشكل شائع.

تضم الأنواع الخمائرية المحبة للدسم والمصنفة ضمن جنس الملاسيزيا وذلك حسب التقنيات الجزيئية ودراسات البنية المستدقة ما يلي:

-الملاسيزيا المتغصنة ***M.Sympodialis***

-الملاسيزيا الكروية ***M.globosa***

-الملاسيزيا المحددة ***M.restricta***

-الملاسيزيا الفرفرية ***M.Furfur***

_الملاسيزيا السلوفية ***M. Sloffiae***

-الملاسيزيا الأبتوز ***M.obtusa***

وتم عزل نوع من الملاسيزيا الجلدية الثخينة ***M.Pachydermatis*** ، وهي غير محبة للدسم، وتتواجد على جلود أنواع عديدة من الحيوانات.

وبعد ذلك في عام 2003 تم استخدام تقنيات تحديد تسلسل الدنا الريباسي لتحديد أنواع جديدة من الملاسيزيا وهي :الملاسيزيا اليابانية ***M.japonica*** والملاسيزيا الجلدية ***M.dermatis*** واللتان عزلتا من المصابين بالتهاب الجلد التأتبي[4] ، والملاسيزيا ياماتونزيز ***M.yamatoensis*** التي عزلت من المصابين بالتهاب الجلد المثي، والملاسيزيا القزمة ***M.nana*** والملاسيزيا الخيلية ***M.equine*** والملاسيزيا الماعزية ***M.caprae*** التي عزلت من أنواع مختلفة من الحيوانات[5،4]

في عام 2010[6] :كان آخر ماعزل من أنواع الملاسيزيا وهو الملاسيزيا الأرنبية ***M.Cuniculi*** من الأرانب.

2-أهم الأمراض التي تسببها الملاسيزيا:

تعد الملاسيزيا من العوامل الممرضة الهامة المسببة لإنتانات الجلد السطحية، وهي لا تصيب الشعر والأظافر والأغشية المخاطية .

تعتبر النخالية المبرقشة هي الإنتان الفطري الأكثر شيوعاً الذي تسببه الملاسيزيا[7]، والأقل شيوعاً هو التهاب الجريبات بالملاسيزيا[8]، والذي يشاهد بشكل شائع عند النساء الشابات، ويرتبط مع النمو المفرط للملاسيزيا الفرفرية والملاسيزيا الكروية ضمن جريب الشعرة، وحدوث التهاب بسبب منتجات الخمائر والحموض الدسمة الحرة الناتجة عن الليباز الفطري.

يرتبط النمط من التهاب الجلد المثي الذي يصيب البالغين بشكل مباشر مع خمائر الملاسيزيا أما التهاب الجلد المثي عند الأطفال فهو أقل ارتباطاً بخمائر الملاسيزيا كما يمكن أن يكون لهذه الخمائر دوراً بحدوث التهاب الجلد التأتبي والفطار

الظفري، ويمكن أن تسبب العد الوليدي وخاصة الملاسيزيا المتغصنة ، وقد تلعب الملاسيزيا دوراً بحدوث الصداف[9].

ويمكن أن تكون الملاسيزيا وخاصة الملاسيزيا الفرفرية مسؤولة بشكل نادر عن حدوث إنتانات رئوية وجهازية عند الأطفال الموضوعين على تغذية وريدية وخاصة عند وجود عوامل مؤهبة عندهم مثل : (العمر الحملي أقل من 33 أسبوع، الوزن أقل من 1000 غرام، البقاء لفترة طويلة في الحاضنة، الاستشفاء الطويل)

أنواع الملاسيزيا	الأمراض السريرية الشائعة
الملاسيزيا الفرفرية	النخالية المبرقشة، التهاب الجلد المثي، التهاب الجريبات، العد الوليدي، التهاب الجفن، والإصابات الجهازية عند الوليد
الملاسيزيا الكروية	التهاب الجلد المثي، السعفة المبرقشة، التهاب الجريبات، العد الوليدي
الملاسيزيا المتغصنة	السعفة المبرقشة، العد الوليدي
الملاسيزيا الجلدية الثخينة	تعزل غالباً من الحيوانات البرية و المنزلية ، وتسبب إصابات جهازية عند البشر، ولها دور في التهاب الجلد المزمن، والتهاب الأذن الخارجية .
الملاسيزيا المحددة	التهاب الجلد المثي، السعفة المبرقشة
الملاسيزيا السلوفية	ليست شائعة
الملاسيزيا الأبتوز	غير شائع عزلها

جدول رقم : (1) يوضح أهم أنواع الملاسيزيا والأمراض الشائعة التي تسببها[9]

3-مقدمة عن الخالية المبرقشة:

النخالية المبرقشة ***Pityriasis Versicolor*** أو السعفة المبرقشة :هي خمج فطري سطحي وسفي مزمن وشائع يصيب الطبقة المتقرنة من الجلد [10،11] ينتج عن فطور خميرية تدعى الملاسيزيا الفرفرية ، والتي تشكل جزءاً من النبيت الطبيعي للجلد[12,13] ، إذ تبلغ نسبة الحملة الأصحاء للملاسيزيا 90-100%.

4-أسباب النخالية المبرقشة :

إن السبب الرئيسي للنخالية المبرقشة هو الملاسيزيا الفرفرية، وكشفت الدراسات الحديثة تورط أنواع أخرى من جنس الملاسيزيا في الإمراضية مثل الملاسيزيا الكروية والمتغصنة [14]، إذ توجد الملاسيزيا المتغصنة بشكل شائع على الجلد الطبيعي.

5-الوبائيات والانتشار:

إن النخالية المبرقشة خمج فطري منتشر عالمياً لكنه أشيع وأكثر انتشاراً في المناطق الرطبة والدافئة، ويرتفع معدل انتشارها في المناطق المدارية ويبلغ حوالي (40-50)% لتوفر الحرارة والرطوبة العاليتين، وينخفض انتشارها في المناطق ذات المناخ البارد مثل السويد وفي المناطق المعتدلة حيث لا يتجاوز معدل انتشارها في تلك المناطق1% [15]

يكون احتمال الإصابة بالنخالية أكثر تواتراً في الأشهر الدافئة من السنة ، وهي مرض شائع خاصة في فصل الصيف، ويتراجع خلال الأشهر الباردة من السنة، كما وتحدث النخالية المبرقشة بشكل أشيع عند المراهقين واليافعين والأعمار الشابة ، وذروة الإصابة بها في العشرينات، ويعزى ذلك إلى التغيرات الهرمونية التي تسبب زيادة فعالية الغدد الزهمية مما يؤدي إلى زيادة إفراز الزهم[16] ، وذلك يشكل بيئة غنية بالشحوم، ويساعد على نمو الملاسيزيا .

يقل حدوث النخالية المبرقشة في المجموعات العمرية الطرفية (الأطفال والمسنين) بسبب قلة إفراز الزهم، ومع ذلك يمكن أن تحدث في أي عمر، كما تصيب كلا الجنسين بشكل متساوي مع اختلاف الحساسية والاستعداد للإصابة بها حسب الأعمار المختلفة[17].

هذا وتجدر الإشارة إلى أن النخالية المبرقشة تحدث عند كل الأعراق البشرية بنسب متساوية[18,19].

6-العوامل المؤهبة للإصابة بالنخالية المبرقشة:

إن العوامل المؤهبة للإصابة متنوعة جداً، والذي يحدد حدوث الإصابة أو عدم حدوثها هو العلاقة بين العوامل المؤهبة واستعداد المضيف للإصابة، ويسبب وجود العوامل المؤهبة البيئية والفيزيائية والحيوية تحول الملاسيزيا من شكلها المطاعم إلى شكلها الممرض [20]وأهم هذه العوامل:

1. الظروف البيئية مثل الحرارة المرتفعة والرطوبة العالية.
2. الاستعداد أو التأهب الوراثي والقصة العائلية الإيجابية في 39% من الحالات (وذلك يزيد من احتمالية الإصابة بالنخالية عند أشخاص سليمين، ومن غير المعروف فيما إذا كانت العوامل الجينية الوراثية أو البيئية لوحدها أو اجتماعها معاً هو المسبب).
3. استخدام الزيوت والمرطبات والكريمات الجلدية (لأنها توسع المسام في الجلد وتؤمن بيئة مناسبة لنمو الملاسيزيا).
4. التعرق المفرط عند بعض الأشخاص أو عند الرياضيين.
5. الجلد الدهني.
6. العلاج بكابتات المناعة مثل :الستيروئيدات مما يساعد على نمو الملاسيزيا[11].

7. وجود أمراض مرافقة حيث إن النخالية أكثر شيوعاً في حال الإصابة ببعض الأمراض مثل :كوشينغ البدئية والعلاجية، أو وجود الأمراض المثبطة للمناعة مثل:(سكري، سرطان، زرع أعضاء،AIDS).
8. سوء التغذية.

7-الآلية الإمراضية لخمائر الملاسيزيا:

إن السبب في كون الملاسيزيا تسبب النخالية المبرقشة في بعض الأفراد بينما تبقى جزءاً من الفلورا الطبيعية عند أشخاص آخرين غير معروف تماماً .

قد يوجد عدة عوامل أهمها المتطلبات الغذائية للملاسيزيا والجواب المناعي للمضيف تجاهها.

تنجم النخالية المبرقشة في معظم الحالات عن اختلال التوازن في الفلورا الطبيعية لجلد المضيف بوجود عدة عوامل مؤهبة تم ذكرها، وتؤدي تلك العوامل إلى تبدل شكل الملاسيزيا من الشكل المبوغ البرعمي الخمائري إلى شكل الأمشاج الفطرية (الأفطورات) أو الشكل الخيطي الذي يستطيع غزو الطبقة المتقرنة باختراقه الخلايا القرنية[21].

أجريت عدة دراسات على مرضى مصابين بالنخالية المبرقشة، ولديهم نقص بالمناعة المتواسطة بالخلايا ، وبينت تلك الدراسات أنه يوجد تثبيط للخلايا T بالمكون الشحمي للجدار الخلوي للملاسيزيا، كما أنه يوجد تنوع كبير بالجواب المناعي المتواسط بالخلايا بسبب التنوع المستضدي الكبير لخمائر الملاسيزيا .

يحدث عند مرضى النخالية الذين ينتجون جواباً مناعياً خلوياً تغيرات نسيجية خلوية كفرط التقرن وتقران(شواك)خفيف، مع درجة خفيفة من الارتشاح الالتهابي تتضمن وجود الخلايا البدينة في الأدمة العلوية، وتبين من خلال التنميط الظاهري

المناعي للارتشاح الالتهابي سيادة لخلايا الذاكرة T وتراكم البالعات، ونقصان الخلايا البائية B وتراكم لخلايا لانغرهانس في البشرة.

وحسب بعض الدراسات فإن أحد العوامل الهامة التي تساعد فطور الملاسيزيا في إحداثها للخمج هي قدرتها على تشكيل الفيلم الحيوي ***biofilm*** ، والذي يعتبر آلية فعالة هامة تساهم في تحولها من الشكل المطاعم إلى الشكل الممرض بوجود عدة عوامل مؤهبة، وبالتالي إحداث النخالية المبرقشة حتى لو كانت مناعة الشخص جيدة، وقد يلعب دوراً هاماً في إزمان الإصابة.

8- آلية حدوث النخالية المبرقشة:

1- حدوث تغير بالعوامل البيئية وعوامل مؤهبة عند الشخص.

2- تشكل الفيلم الحيوي من قبل الملاسيزيا الفرفرية (التي تشكل جزءاً من الفورا الطبيعية).

3-فشل العلاج بالتخلص من الفيلم الحيوي وبالتالي حدوث الإزمان .

تستطيع كثير من الأحياء كالجراثيم والعديد من الفطور كالشعروية والمبيضات والملاسيزيا أن تشكل الفيلم الحيوي[23,22]، والذي يلعب دوراً في حماية تلك العوامل الممرضة من الجواب المناعي للمضيف، ويمثل حاجزاً آمناً ضد المعالجة المضادة لتلك العوامل [25,24].

يتركب الفيلم الحيوي بشكل عام من لحمة ***matrix*** والتي تتكون من عديد السكاريد خارج الخلوي، البروتين ***amyloid*** ، و ***DNA*** وألياف التصاق تؤمن التصاق العوامل الممرضة على السطوح الحيوية كالجلد [26,23] ، كما يضم الفيلم الحيوي الفطري في الملاسيزيا أشكالاً خمائرية وخيطية يعتقد أنها تساهم في زيادة الالتصاق على السطوح الحيوية، بالإضافة إلى الكيتين و 3-1 Bغليكان كربوهيدرات[22].

وجد كل من ***Cannizo*** و ***Figueredo*** أن فطور الملاسيزيا لها القدرة على إنتاج الفيلم الحيوي في الجسم الحي عند الإصابة، وفي المختبر بعد زرعها[9]

إذ تستطيع الملاسيزيا الفرفرية والبيضوية إنتاج الفيلم الحيوي بسبب بروتين الأميلوئيد الذي يشكل البنية الأساسية لأغشيتها الحيوية، وتتناسب نوعية الفيلم الحيوي الذي تشكله الملاسيزيا مع مستويات الفوسفولیباز في جدارها، ويعد الليباز الأنزيم الأهم للملاسيزيا حيث يشطر الغليسيريدات الثلاثية لليبيدات الجلد إلى حموض دسمة مشبعة وغير مشبعة، هذا وتحتاج الملاسيزيا للحموض الدسمة المشبعة لتنمو، أما الحموض الدسمة غير المشبعة فإنها تخترق الطبقة المتقرنة، وتخرب الوظيفة الحاجزية مما يسبب تهيجاً يؤدي إلى الإصابة .

من ناحية أخرى لا تسبب الملاسيزيا جواباً التهابياً عند المضيف، لأنها تقلل من التعبير عن السيتوكينات الالتهابية في الخلايا الكيراتينية مثل: (انترلوكين 1 وانترلوكين6) والعامل المنخر للورم إلفا[23] .

يكون جدار الملاسيزيا غنياً بالليبيدات التي تقلل من الاستجابة المناعية عند المضيف مما يفسر قدرتها على النمو جيداً عند الأشخاص الأصحاء[27].

تؤدي الإصابة بالنخالية المبرقشة إلى حدوث تبدل تصبغي، ويحدث إما زيادة أو نقصان تصبغ، ويوجد عدة آليات مفترضة لتفسير نقص التصبغ تتضمن إنتاج الملاسيزيا للحموض ثنائية الكربوكسيل، والتي تقوم بتثبيط أنزيم التيروزيناز في الخلايا الميلانية البشروية وخاصة حمض الأزليك ***azelaic*** الذي يتم إنتاجه بواسطة الليباز الموجود في الملاسيزيا[11]، وتسبب تلك الحموض آثاراً سامة مباشرة على الخلايا الميلانية، وتؤدي إلى تنكس المتقدرات مما يفسر استغراق عودة تصبغ الجلد من أشهر إلى سنوات بعد الشفاء.

ومن النظريات الأخرى لتفسير نقص التصبغ حدوث نقص في إنتاج الجسيمات الميلانية بدون حدوث تغير في كثافة الخلايا الميلانية، أو منع انتقال الجسيمات الميلانية إلى الخلايا الكيراتينية، أو بسبب دور الملاسيزين المفرز من خمائر الملاسيزيا في تحريض استموات الخلايا الميلانية.

وتتضمن الآليات المقترحة لتفسير زيادة التصبغ ظهور جسيمات ميلانية كبيرة وغير طبيعية ناتجة عن الالتهاب، بينما تكون الجسيمات الميلانية أصغر منها في الآفات ناقصة التصبغ، وقد يعزى فرط التصبغ لوجود طبقة كيراتينية أكثر سماكة، وزيادة الخيوط الموترة في الطبقة الحبيبية[28]، بالإضافة إلى دور البيترياسيترين الذي تنتجه الخميرة، ويقوم بامتصاص الأشعة فوق البنفسجية مما يؤدي إلى زيادة تصبغ الجلد المصاب، ويبقى خلل التصبغ الذي تسببه الملاسيزيا غامضاً وغير واضح بشكل تام.

9- أماكن توضع الآفات:

أوضحت دراسات عديدة مواقع إصابة الأنواع المختلفة من الملاسيزيا للجلد الطبيعي، واعتمد بعضها على الفحص المجهري المباشر، وبعضها على الزرع الفطري، وبعضها على التنميط الجزيئي لوحده، وبينت تلك الدراسات أن آفات النخالية المبرقشة أكثر ما تتوضع على الجذع العلوي والرقبة والكتفين وأماكن الثنيات والذراعين[30,29]، وبالتالي يعكس توزع الآفات على تلك المناطق الطبيعة المحبة للدسم لهذه الفطور وألفتها للمناطق ذات الإفراز الزهمي.

إن الموقع الأكثر إصابة بالنخالية المبرقشة هو الجذع العلوي، ولكنه غالباً ينتشر إلى الذراع العلوي والرقبة والبطن.

تحدث الآفات بشكل أقل شيوعاً في الإبط والمناطق الإربية والفخذين والأعضاء التناسلية وأسفل الساعدين واليدين، ويمكن أن تصاب الحفرة المأبضية بشكل نادر [31].

قد يصاب الوجه والفروة خاصة عند الأطفال، وعند استخدام مستحضرات موضعية من الستيروئيدات.

وفيما يلي صور بعض المظاهر السريرية للنخالية المبرقشة وأهم أماكن التوضع:

الشكل (1) نخالية مبرقشة على الصدروالجذع العلوي

الشكل (2) نخالية مبرقشة على الصدر والرقبة وأعلى الكتفين

10- التظاهرات السريرية للنخالية المبرقشة:

تكون الآفات بشكل لويحات أو بقع واضحة الحدود بيضوية أو دائرية، تقيس عدة ميليمترات بقطر (1-3) سم، وتتوزع بشكل متناظر ضمن المنطقة المصابة، وعليها وسوف دقيقة وناعمة ، ويمكن إظهار تلك الوسوف بحف الآفة بمشرط.

يمكن أن تكون الآفات ناقصة التصبغ أو زائدة التصبغ (نادراً)، وأحيانا تصبح متمادية ومنتشرة بشكل واسع، ويمكن أن تكون بشكل حمامي، ومن هنا جاءت تسميتها بالنخالية المبرقشة حيث يتراوح لون الوسوف من شاحب إلى بني متوسط.

يوجد تباين واختلاف واضح بين لون الجلد المصاب ناقص الميلانين والجلد الطبيعي المحيط بمنطقة الإصابة، والذي يكون مصطبغاً بشكل أغمق، ففي الجلد الفاتح تكون المناطق المصابة أغمق من الطبيعي و بلون أصفر أو بني (قهوة بحليب) أما في الجلد القاتم عند ذوي البشرة السوداء فتبدو الآفة ناقصة التصبغ بلون شاحب، وعندما تكون الآفة زائدة التصبغ يلاحظ اصطباغ خفيف واسمرار في الجلد المصاب، ويبدو بلون بني غالباً.

بالإضافة إلى التغير في لون الجلد عند مرضى النخالية المبرقشة يمكن أن يلاحظ أيضا تهيج خفيف في الجلد، ودرجة خفيفة من الالتهاب تسبب لوناً زهرياً.

وتأخذ النخالية المبرقشة ثلاثة أشكال سريرية إضافة إلى الشكل الضموري النادر[32]

الشكل المصطبغ :يتظاهر ببقع محددة تماماً بلون القهوة المائلة للصفرة المتسخة أو البني، ثم تتسع وتتداخل فيما بينها لتعطي أشكالاً جغرافية غير منتظمة، تغطيها وسوفاً نخالية الشكل وناعمة تشبه الغبار، وتصبح أكثر وضوحاً بعد حك الجلد أو تمطيطه [33,16]وهي علامة مشخصة لتفريقها عن اضطرابات التصبغ الأخرى.

الشكل القاصر : تبدو البقع بلون أبيض أفتح من الجلد المحيط بها، ويعود نقص اللون إلى حمض الأزليك الذي تفرزه خمائر الملاسيزيا، ويخرب الصباغ الجلدي.

الشكل المقلوب :يأخذ توزعاً مختلفاً فيصيب مناطق الثنيات، أو يظهر كبقع معزولة على الأطراف، ويشاهد غالباً عند مثبطي المناعة[32].

أما **الشكل الضموري** فهو نادر ويتظاهر بآفات ضامرة مدورة إلى بيضوية عاجية اللون إلى حمامية، وقد يكون سطحها مجعد، ويكون الضمور محدوداً فقط بمكان الجلد المصاب بالنخالية[34] ، ويظهر عند مستخدمي الستيروئيدات الموضعية.

يكون الخمج بالنخالية المبرقشة غير عرضي غالباً، ويترافق أحياناً مع حكة خفيفة، وتوجد الحكة الشديدة في الظروف الدافئة والرطبة، وتكون شكاية المرضى غالباً بسبب التغير اللوني الناتج عن اضطراب الصباغ وليس بسبب الأعراض[35].

11-التشخيص التفريقي للنخالية المبرقشة:

يشمل التشخيص التفريقي للنخالية المبرقشة ما يلي:

-البهاق ***Vitiligo***

-الكلف ***Melasma***

-النخالية البيضاء ***Pityriasis Alba***

-النخالية الوردية ***Pityriasis Rosea***

-الفطار الفطراني ناقص التصبغ ***Hypopigmentation Mycosis Fuungoides***

-الصداف النقطي ***Guttate Psoriasis***

-الورام الحليمومي الشبكي المتلاقي ***Conflicting Retinoblastoma***

-السفلس الثانوي ***Secondary Syphilis***

-التهاب الجلد المثي ***Seborrheic Dermatitis***

-سعفة الجسد ***Tinea Corporis***

-الوذح ***Erythrasma***

تميز النخالية المبرقشة عن الآفات المشابهة لها سريرياً، حيث تغيب الوسوف بشكل كامل في البهاق والكلف، ويبدي التهاب الجلد المثي وسعفة الجسد والنخالية الوردية والسفلس الثانوي تغيرات التهابية أكثر مما يشاهد في النخالية المبرقشة، ويماثل الوذح النخالية المبرقشة من حيث التغيرات الصباغية، لكن بيدي غالباً تألقاً بلون أحمر آجري باستخدام أشعة وود.

12- الاستقصاءات وطرق التشخيص:

يعتمد تشخيص النخالية المبرقشة بشكل رئيسي على المظهر السريري (نقص أو زيادة تصبغ المنطقة المصابة) ووجود بقع أو لويحات عليها وسوف دقيقة وناعمة[38,37,36].

ونذكر من طرائق التشخيص:

أشعة وود : تتألق وسوف النخالية المبرقشة بلون أصفر ذهبي عند تعريضها لأشعة وود من المحتمل أنه بسبب إنتاج البورفيرين ***porphyrin*** كمستقلب فطري، أو تظهر الآفات أغمق من الجلد السليم المجاور[16].

التشريح المرضي : تضم الموجودات في خزعة الجلد المصاب فرط تقرن وشواك خفيف وارتشاح حول وعائي خفيف في الأدمة، وعند استخدام ملون الهيماتوكسيلين أيوزين تشاهد عناقيد من خمائر متبرعمة وخيوط فطرية قصيرة ذات حواجز متفرعة أحياناً ضمن الطبقة المتقرنة[16] ، أو باستخدام تلوين ***PAS*** الذي يزيد من دقة التشخيص[39].

وتتضمن طرق التشخيص المخبري للنخالية المبرقشة:

1-**الفحص المجهري المباشر** : لوسوف النخالية المبرقشة المشففة باستخدام KOH 30%، ويعد ذلك الاختبار التشخيصي الذي تجريه معظم المخابر، حيث تشاهد الملاسيزيا تحت المجهر على شكل أفطورات ***mycelium*** خشنة وغليظة تنفصل غالباً عن خيوط قصيرة ومجزأة تقيس 2-5 ميكرون عرضاً، وحتى 25 ميكرون طولاً، ومعها خمائر متبرعمة بقطر 2-8 ميكرون كروية الشكل ثخينة الجدار، وذلك يؤكد التشخيص.

يبقى الشكل الأفطوري هو الميزة التشخيصية الأهم ، وأحيانا يتواجد بأعداد كبيرة مع عدد قليل من الأشكال الخمائرية.

يبدو المنظر المميز لفطور الملاسيزيا تحت المجهر (منظر الخيوط والخمائر) مشابهاً لمظهر السباغيتي وكريات اللحم ***spaghetti and metaballs*** أو لمظهر الموز والعنب ***bananas and grapes*** [40] .

ويمكن أن تلاحظ الأفطورات الخشنة مع خمائر متبرعمة ناتجة عن قاعدة ضيقة ويتناسب ذلك غالباً مع الملاسيزيا الكروية ، ويمكن أن تلاحظ الأفطورة مع أشكال خمائرية متبرعمة من قاعدة عريضة، ويشير ذلك غالباً إلى الملاسيزيا الفرفرية أو الأبتوز.

2- التلوين بزرقة الميتلين أو الحبر الصيني : تلوين الوسوف ورؤية الخلايا الخمائرية مع الخيوط الفطرية القصيرة بشكل أوضح بالفحص المجهري، وهي طريقة مخبرية سهلة وسريعة مقارنة مع التشريح المرضي والتلوين ب PAS [42,41].

3- طريقة الشريط اللاصق : وهي طريقة مخبرية تعتمد على أخذ عينة من الجلد المتوسف، حيث يتم اختيار بقعة واضحة من الجلد المصاب، وترطب برفادة من الشاش المغموسة في محلول الإيوزين 1%، ثم تترك لتجف دقيقة واحدة، وتوضع قطعة من الشريط اللاصق على اللطخة وتضغط جيداً، ثم يوضع الشريط اللاصق على شريحة مجهرية لفحصها، وتشاهد الملاسيزيا على شكل كومة من حبيبات كبيرة(الأبواغ) وتبدو هذه الأبواغ بيضاء على خلفية وردية اللون إذا عومل الجلد بالإيوزين ومدورة وثخينة الجدار، مصطفة في عناقيد أو أكوام ويرى أحياناً بعض التبرعم، أما خيوط الأفطورة تبدو على شكل عصيات طويلة ومنحنية وذات تفرعات وملتوية بشكل الإصبع.

4- الزرع :لا يعد ضرورياً لتشخيص النخالية المبرقشة ولا يجرى بشكل روتيني، وذلك لصعوبة عزل العامل المسبب، ويستغرق وقتاً طويلاً للنمو كما يجب إضافة

مواد دسمة مثل زيت الزيتون المعقم إلى أوساط زرع الفطور الروتينية حتى تنمو خمائر الملاسيزيا[16]، وتنمو بشكل أفضل في درجة حرارة 37 .

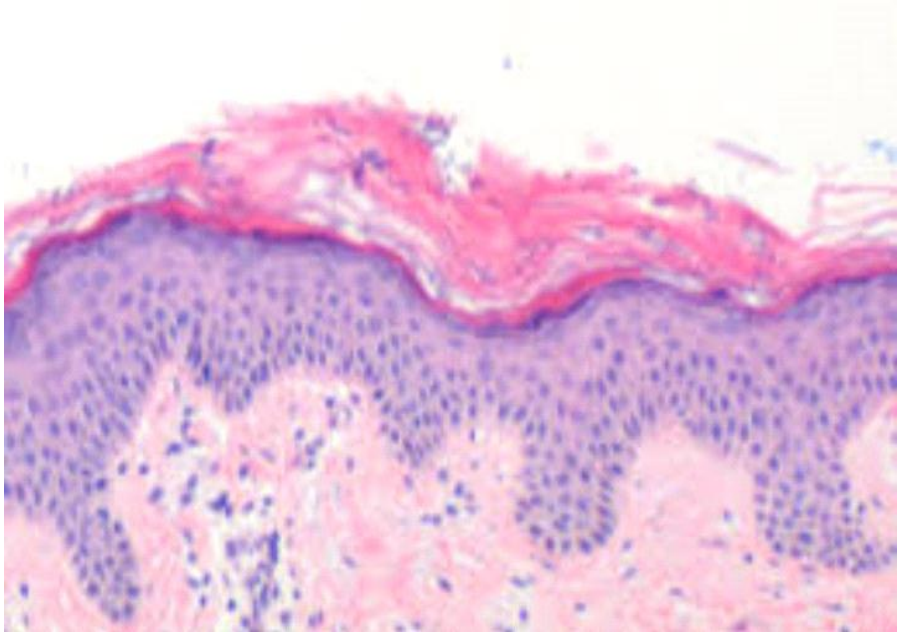
المظهر العياني المستعمرات : ترى بلون متجانس بلون القهوة بحليب إلى رمادي وسطحها أملس إلى خشن مجعد، وتكون المستعمرات جافة أو كامدة.

المظهر المجهري المستعمرات : تبدي المزارع الأولية سيطرة الأبواغ مع ندرة الخيوط أما في المستعمرات الأقدم تبدي غناها بالخيوط مقارنة مع المزارع الأولية.

وإذا لم تشاهد علامات النمو السابقة في وسط الزرع خلال عشرين يوماً فإن النتيجة تعتبر سلبية.

ويعتبر الكشف المجهري المباشر عن الأفطورات الخشنة والأشكال الخمائرية أهم طريقة للتشخيص المخبري والتي تؤكد التشخيص السريري، وبما أن الملاسيزيا تشكل جزءاً من الفلورا من الطبيعية فإن عزلها من الجلد ليس له قيمة تشخيصية تنبؤية، ولا يعتمد على ذلك الإجراء في المختبرات، وأتاح استخدام التقنيات الجزيئية مجالات أوسع للبحث عن ذراري الملاسيزيا .

الشكل (3) محضر لوسوف النخالية المبرقشة معامل ب KOH يظهر عناقيد من الخمائر والأفطورات القصيرة



الشكل (4) الخمائر والخيوط الفطرية القصيرة للنخالية المبرقشة في الطبقة المتقرنة ، مع تلوينPAS

ومن طرق التشخيص المخبري للنخالية المبرقشة والتي يمكن استخدامها طريقة تلوين غرام وهي طريقة مخبرية سهلة وبسيطة يمكنها إظهار الإصابة[43].

وسنتكلم عنها بالتفصيل كونها الجزء الأهم من موضوع دراستنا.

13- تلوين غرام:

هو التقنية الأكثر أهمية والمستخدمة بشكل واسع في علم الأحياء كطريقة تلوينية تفريقية، وسمي بتلوين غرام نسبة إلى عالم الأحياء المخترع ***Christian Gram*** الذي طور هذه التقنية [44]عام **1884** ليس فقط من أجل التمييز بين الأحياء الدقيقة، وإنما لجعلها مرئية بصورة أوضح.

ويسمح تلوين غرام بتمييز الأحياء الدقيقة كالجراثيم والفطور اعتماداً على الخصائص الكيميائية والفيزيولوجية لجدر خلاياها، ويعتبر الاختبار التفريقي الأول الذي يستخدم لمعرفة وتمييز الأحياء الدقيقة، فهو يسمح بتحديد ترتيب وشكل الخلايا .

يعتبر تلوين غرام وسيلة تشخيصية قيمة عند ترافقه مع الاستقصاءات السريرية، وهو طريقة بسيطة تساعد في الوصول للتشخيص المبدئي للأحياء الدقيقة، ويتم تصنيف الأحياء حسب تلوينها بغرام إلى إيجابية غرام وسلبية غرام.

13-1 مبدأ تلوين غرام:

يحدد الجدار الخلوي لخلايا الأحياء فيما إذا كانت إيجابية أو سلبية غرام عندما يتم التثبيت والتلوين البدئي باستخدام بنفسجية الجانسيان، فإن بعض الأحياء تكون قادرة على الاحتفاظ بالملون البدئي لأنها تقاوم إزالة اللون وتدعى إيجابية غرام، ويوجد أحياء دقيقة أخرى تفتقد الملون البدئي بعد إضافة مزيل اللون وتدعى سلبية غرام.

13-2 مكونات تلوين غرام:

1- **البنفسجية المتبلورة *Giant Violet*** أو بنفسجية الجانسيان :تنفصل إلى أيونات cv^+ و cl^- في المحاليل المائية ، وتنفذ تلك الأيونات عبر الجدار الخلوي والغشاء الخلوي لكل من الخلايا إيجابية وسلبية غرام.

2- **اللوغول أو المحلول اليودي (الأيودين)** : يرتبط مع cv^+ ويشكل معقد كبير مع البنفسجية المتبلورة ضمن الطبقات الخارجية والداخلية للخلايا .

3- **مزيل اللون** :يتكون من الكحول والأسيتون، ويتداخل مع ليبيدات الغشاء الخلوي، ويزيل لون بعض العضيات عندما لا يكون ملون البنفسجية المتبلورة مثبتاً بقوة بالمحلول اليودي، ولا يزيل لون العضيات الأخرى عندما يكون ملون البنفسجية مثبتاً بقوة بالمحلول اليودي.

4- **محلول الكربول فوكسين *fuchsine* أو الحمرة المتعادلة أو السافرانين : *safranin*** وهو ملون مشحون إيجابياً يضاف في المرحلة الأخيرة من تلوين غرام، ويلون العضيات سلبية غرام والتي زال لونها بالإيتانول باللون الزهري أو الأحمر، وليس له تأثير على بقية العضيات إيجابية غرام والتي تحتفظ باللون البنفسجي القاتم .

وسنأتي على ذكر طريقة تلوين غرام بالتفصيل في القسم العملي.

13-3 مصادر الخطأ في تلوين غرام:

يكون تلوين غرام إيجابي كاذب للأسباب التالية:

-وجود شوائب في محلول بنفسجية الجانسيان(يجب ترشيحه قبل استعماله) .

-عدم غسيل اللوغول بشكل كامل.

-عدم ترك مزيل اللون (أسيتون – إيتانول) على الشريحة مدة كافية.

-محلول الكربول فوكسين أو السافرانين قوي جداً أو تركه على اللطاخة مدة طويلة.

يكون تلوين غرام سلبي كاذب للأسباب التالية:

-عدم ترك المحلول اليودي على الشريحة مدة كافية.

-ترك مزيل اللون على الشريحة مدة طويلة أو عدم غسله بشكل مناسب .

13-4 نتائج تلوين غرام:

الأحياء إيجابية غرام :تتلون باللون الأرجواني الغامق وتملك بشكل عام غشاء مفرد يحيط به بيبتدوغليكان ثخين وبشكل عام فإن إيجابيات الغرام مشتقة من شعبة متينات الجدار، والتي تضم العديد من الأجناس المعروفة مثل :العنقوديات – العقديات –الليستريةِ[46,45]

كما تعد الخمائر الفطرية إيجابية غرام أيضاً.

الأحياء سلبية غرام :تتلون باللون الأحمر الغامق مثل :المستدمية النزلية – الملتوية البوابية – الكليبسلا.

بعض الأحياء لا يمكن تحديدها وتمييزها بتلوين غرام لأنها لاتتلون به، وبالتالي لا يمكن تحديد فيما إذا كانت إيجابية أو سلبية غرام، وإنما تحتاج لملونات أخرى مثل : المتفطرة السلية والمتفطرة الجذامية.

من جهة أخرى لا تتلون بعض الأحياء كاالمفطورات بغرام لعدم وجود جدار.

13-5 تفسير نتائج تلوين غرام:

تحوي العضيات سلبية غرام مثل بعض الجراثيم على طبقة إضافية من عديد السكاريد الشحمي، والتي تذوب عند إضافة الكحول كما تحوي على طبقة رقيقة من البيبتيدوغليكان حوالي (1-2) طبقة[47]، ولهذا السبب تفشل الأحياء سلبية غرام بالاحتفاظ بالمعقد اللوني الذي يزول مع الغسيل ، وتتلون تلك الخلايا بالزهري أو الأحمر عند إضافة الملون الأخير (سافرانين أوفوكسين).

أما بالنسبة للعضيات إيجابية غرام فيحتوي جدارها على ثقوب تغلق وتمنع الملون من الخروج من الخلية عند إضافة مزيل اللون، وتعود تلك القدرة على الاحتفاظ بالمعقد اللوني الكبير(بين البنفسجية والإيودين) إلى طبيعة البيبتيدوغليكان في جدارها الخلوي، والذي يكون بشكل طبقة ثخينة ومتعددة غالباً أربع طبقات، والذي يمكنها من الاحتفاظ بالملون.

13-6 تفسير التلون إيجابي الغرام لخمائر الملاسيزيا:

وجدت بعض الدراسات أن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة تتلون بتلوين غرام أي إنها إيجابية غرام وتأخذ اللون الأرجواني الغامق، ولم تشاهد تلك الظاهرة في اضطرابات تبدل التصبغ الأخرى، وتم الاستفادة من ذلك في استخدام تلوين غرام كاختبار تشخيصي سهل للكشف عن فطور الملاسيزيا[48].

إن الآلية الأساسية لتلوين غرام هي الاحتفاظ بملون البنفسجية المتبلورة التي تتمتع بفعالية عالية في تلوين العضيات إيجابية الغرام، وذلك بسبب قدرتها على النفاذ إلى جدار الخلية والارتباط بشكل تساهمي مع البروتينات.

إن الفطور ومن ضمنها الملاسيزيا قادرة على الاحتفاظ بملون البنفسجية حتى بعد الغسيل بالكحول، والسبب في ذلك تشكيل معقد تساهمي بين البنفسجية والبروتينات الموجودة في جدار الفطور، ويعتبر وجود بروتين الأميلوئيد ***amyloid*** في جدار الملاسيزيا دليل على إيجابية تلوين غرام للملاسيزيا.

هذا وتعد خمائر الملاسيزيا إيجابية غرام أيضاً بسبب تشكيل معقد تساهمي بين البنفسجية وثيوريدوكسين ريدوكتاز 2 ***thioredoxin reductase*** [49]، ويقاوم ذلك المعقد إزالة اللون.

14- سير المرض والإنذار:

إن النخالية المبرقشة من الأمراض الجلدية الفطرية الخالية من المضاعفات، ويمكن أن تتحول إلى مرض مزمن في حال عدم العلاج أو إذا كان العلاج غير فعال[10].

وهي مرض غير معد لأن العامل المسبب لها يشكل جزءاً من الفلورا الطبيعية للجلد[32]، و لا تؤدي الإصابة بها إلى تندب .

النخالية المبرقشة ذات إنذار ممتاز فهي قابلة للعلاج رغم نسبة النكس العالية[50].

15- علاج النخالية المبرقشة:

إن درجات الشفاء من النخالية المبرقشة عالية والعلاج متوافر لكن النكس شائع، ويحدث في العديد من الحالات بالرغم من العلاج الفعال[53,52,51].

تحتاج النخالية المبرقشة لعلاج صيانة طويل الأمد بسبب معدل النكس العالي [54] حيث يوجد ميل لتكرار وعودة الإصابة في 60% من الحالات بعد سنة من العلاج وفي 80% من الحالات بعد سنتين من العلاج.

يمكن علاج النخالية المبرقشة بشكل فعال إما بمضادات فطرية موضعية أو جهازية[29].

العلاج الموضعي : يعتبر الخط الأول للعلاج ومن المعالجات الموضعية :

1- مركبات الآزول مثل (كلوتريمازول 1%، كيتوكونازول 2%، إيكونازول، إيزوكونازول) لها دور جيد في علاج النخالية المبرقشة، وتطبق مرتين يومياً لأسبوعين[55].
2- تيربينافين ***terbinafine*** على شكل كريم 1% فعال أيضا في العلاج.
3- سولفيد السيلينيوم 2.5% وهو منظف قاعدي على شكل شامبو يطبق على المناطق المصابة لمدة لا تقل عن عشر دقائق قبل غسله، ولمدة أسبوعين متتاليين مع تجنب تطبيقه لفترة طويلة خشية امتصاصه، ويؤدي تطبيقه

على الوجه والأعضاء التناسلية إلى تهيج جلدي، وعندها يمكن استخدام بديل وهو محلول هيبوسلفيت الصوديوم ***sodium hyposulphite*** 20% .

4- سيكلوبيروكسأولامين 1% ويوجد بشكل كريم أو شامبو.

يجب قبل تطبيق تلك الأدوية الموضعية الاستحمام أولا بماء ساخن وصابون، وإزالة الطبقة المتقرنة أثناء الاستحمام، والغاية من ذلك إزالة أكبر عدد ممكن من الفطور والسماح للدواء بالتماس المباشر مع ما تبقى من الآفات، ويدهن الدواء بعد الاستحمام على أماكن الإصابة مرتين يومياً إلى أن تختفي الآفات.

المشكلة الأساسية في استخدام مضادات الفطور الموضعية هي صعوبة تطبيق الكريمات على كافة المناطق المصابة الواسعة بالإضافة إلى قوامها الزيتي، ولذلك تفضل البخاخات والشامبوات على الكريمات.

يملك الكيتوكونازول الفعالية الأقوى ضد الملاسيزيا في المختبر لذلك يعد العلاج الموضعي الأمثل للنخالية[8] ، ويمكن تطبيقه بشكل كريم أو محلول رغوي (شامبو) ويفضل أن يستخدم الكيتوكونازول بشكل شامبو في الإصابات الواسعة.

العلاج الجهازي : تعتبر مضادات الفطور الفموية (الجهازية) هي الخط الثاني للعلاج، ويطبق العلاج الجهازي في حال عدم الاستجابة على العلاج الموضعي، أو صعوبة تطبيق العلاج الموضعي على المساحات الواسعة وفي الحالات الناكسة أو الشديدة .

يمكن إستخدام الإيتراكونازول والفلوكونازول والكيتوكونازول كعلاجات جهازية.

يعتبر الإيتراكونازول فعالاً في حالات الإصابة الواسعة، وهو العلاج الفموي الأمثل للنخالية المبرقشة، ويمثل الفلوكونازول بديلا فعالاً[8]، كما يوصى باستعمال الفلوكونازول بدل الإيتراكونازول بسبب التداخلات الدوائية للأخير [56].

يفضل استخدام الفلوكونازول على الكيتوكونازول الفموي والذي لم يعد يستعمل في علاج الإنتانات الفطرية الجلدية بسبب تأثيراته الجانبية الخطيرة السامة للكبد وإحداثه اضطرابات بالكظر، وتداخلاته الدوائية الخطيرة التي تفوق فائدته في علاج هذه الحالات [57].

لا يعد التيربينافين الفموي فعالاً في علاج النخالية المبرقشة لأنه لا يفرز مع العرق، وقد لا يصل إلى تراكيز علاجية كافية في الطبقة المتقرنة.

في حال النكس المتكرر قد يفيد الاستخدام الشهري للأدوية الموضعية أو الفموية في منع الهجمات لاحقاً[58].

العلاج الموضعي	شامبو مضاد للفطور يطبق على المنطقة المصابة لمدة (10–15) دقيقة مرتين يومياً لمدة (2–3) أسابيع
	1. شامبوسلفيد السيلينيوم 2.5% 2. شامبوكيتوكونازول 2% 3. شامبو سيكلوبيروكسأولامين 1% 4. شامبو هيبوسلفات الصوديوم 20%
	كريمات مضادة للفطور تطبق على الآفة لمرة أو مرتين يوميا لمدة أسبوعين
	1. مركبات الإيميدازول مثل كريم كيتوكونازول 2% 2. كريم سيكلوبيروكسأولامين 0.77% أو لوشن أوجيل 3. كريم تيربينافين 1%
العلاج الجهازي(الفموي)	1. اتراكونازول 200–400 ملغ يومياً لمدة (5–7) أيام[16] 2. فلوكونازول 150–300 ملغ أسبوعياً لمدة (2–4) أسابيع [16] 3. كيتوكونازول جرعة200 ملغ يومياً لمدة (7–10)أيام

الجدول رقم (2) أهم العلاجات الموضعية والفموية مع جرعاتها

يمكن أن يبقى نقص الصباغ في بعض المناطق لفترة معينة تتراوح من أسابيع إلى أشهر حتى لو تم القضاء على العوامل الممرضة واختفت الوسوف وذلك غالباً بسبب حدوث تأذي في الخلايا الميلانية وتنكس في المتقدرات.

هذا ويمكن أن تستغرق استعادة اللون الأصلي للمنطقة المصابة بعد العلاج من أسابيع إلى أشهر مما يوحي للمريض بفشل العلاج ولكن ما يدل على استمرار الخمج والحاجة لمزيد من العلاج هو استمرار وجود الوسوف والمظهر المجهري المميز (السباكبتي وكرات اللحم).

ثانياً :الدراسة العملية:

1-أهمية البحث:

تعد النخالية المبرقشة من الأخماج الفطرية الشائعة والمنتشرة عالمياً، كما تنتشر بشكل كبير في بلادنا، وتشكل نسبة كبيرة من مراجعي العيادات الجلدية.

ويعتمد تشخيصها بشكل رئيسي على المظاهر السريرية لكن لابد من إجراء الفحوص المخبرية لتأكيد تشخيص النخالية المبرقشة ونفي الأمراض الجلدية الأخرى التي تدخل في تشخيص تفريقي معها كالبهاق والنخالية البيضاء والنخالية الوردية وغيرها من الآفات وإن آفات النخالية أكثر ماتتوضع على الجذع العلوي والرقبة وأعلى الذراعين بشكل بقع زائدة الصباغ أو بقع وسفية واضحة الحدود مدورة أو بيضوية ناقصة الصباغ ، فهي تؤثر على الناحية الجمالية خاصة عند الإناث ولذلك من الهام تشخيصها بدقة حتى يتمكن الطبيب من وضع العلاج بشكل أسرع مما يحد من تفاقم المشكلة الجمالية.

ومن هنا أجرينا بحثنا هذا لتبيان أهمية التشخيص المخبري في تأكيد أو نفي الإصابة الفطرية بالنخالية المبرقشة، إذ تم في هذا البحث دراسة طريقة جديدة مخبرياً وهي تلوين غرام لتشخيص النخالية المبرقشة مما يفيد في تأكيد أو نفي التشخيص السريري، وتم مقارنة حساسية تلك الطريقة مع حساسية التحري المباشر (وهي الطريقة المخبرية المستخدمة روتينياً) .

وكانت دراستنا الأولى من نوعها التي استخدم فيها تلوين غرام لتشخيص النخالية المبرقشة مخبرياً.

2- هدف البحث :دراسة حساسية تلوين غرام في تشخيص النخالية المبرقشة مخبرياً ومقارنتها مع حساسية التحري المباشر.

3-المواد والطرائق:

3-1 مكان وزمان الدراسة :تم العمل المخبري في مخبر الفطور في مشفى الأمراض الجلدية الجامعي في دمشق .

زمان الدراسة :عام كامل **2018-2019**

3-2 مجموعة الدراسة : المرضى المراجعين لمشفى الأمراض الجلدية الجامعي ممن تم تشخيص إصابتهم بالنخالية المبرقشة سريرياً وذلك خلال فترة الدراسة.

حيث شملت الدراسة 51 عينة تابعة لمرضى من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة، وتم إجراء دراسة مقطعية عرضية ***cross –sectional study*** على العينات، وتم حساب حجم العينة من الموقع التالي:

www.powerandsamplesize.com

-sample size nB = 51

-power 1-β = 0.80

-Type 1 error rate α = 5%

معايير قبول المرضى:

- وجود مظاهر سريرية مؤكدة.
- أخذ موافقة المريض بعد اطلاعه على الموافقة المستنيرة.
- عدم استخدام أي علاج فطري موضعي أو جهازي من قبل المريض خلال الأسابيع الثلاثة الماضية السابقة لإجراء الدراسة.
- عدم الاستحمام لمدة لا تقل عن 5 أيام قبل أخذ العينة.

معايير استبعاد المرضى :

استبعدنا من دراستنا المرضى الذين استحموا خلال 5 أيام قبل أخذ العينة ، كما استبعدنا المرضى الذين استخدموا علاج فطري موضعي أو جهازي خلال الأسابيع الثلاثة الماضية السابقة لإجراء الدراسة (لأن الآفات المعالجة لا تملك سوفاً).

الاعتبارات الأخلاقية (الموافقة المستنيرة):

يعتمد البحث على ضرورة سرية البيانات التي تم الحصول عليها مع التأكيد على أخذ الموافقة من المرضى على المشاركة في الدراسة.

استمارة موافقة على المشاركة في الدراسة :

اسم المريض: **رقم المريض:**

التاريخ:

عنوان الدراسة :دراسة حساسية تلوين غرام في الكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة.

- **أؤكد أني قرأت و فهمت المعلومات الخاصة بالدراسة ,و أتيحت لي الفرصة لطرح أي أسئلة خاصة بالدراسة أو اشتراكي فيها.**
- **أفهم أن لي مطلق الحرية في الاشتراك في الدراسة ,و أن من حقي الانسحاب من الدراسة في أي وقت أريده دون إبداء اية أسباب ,و دون أي مؤاخذة قانونية لانسحابي من الدراسة.**
- **أعطي موافقتي على أن تتاح نسخة من مستندات موافقتي على الاشتراك في الدراسة والتي تحتوي معلومات خاصة بي إلى أي فريق طبي أو بحثي قد يساهم بالدراسة أو بنشرها وذلك لأجل متابعة الدراسة فقط .**
- **أوافق على اطلاع طبيبي الخاص على اشتراكي في هذه الدراسة.**
- **أوافق على الاشتراك في هذه الدراسة.**
- **توفير تفاصيل سير الدراسة لي بعد تماثلي للشفاء.**
- **اسم المريض** **:توقيع المريض:**
- **اسم الطبيب الطالب للموافقة** **:توقيعه:**

3-3المواد المستخدمة في الدراسة :

- سلايدات لوضع الوسوف عليها بعد أخذها.
- كحول طبي(إيتانول) تركيز 99.9% لتثبيت الوسوف على السلايدات.
- كزيلول لتشفيف الوسوف.
- سواتر زجاجية.
- طقم ملون غرام (بنفسجية الجانسيان، لوغول، مزيل اللون ، فوكسين)

- حوض تلوين مع حامل.
- مجهر ضوئي.
- ممصات باستور.
- زيت الأرز.

3-4 طرائق الدراسة:

تم اختيار مرضى الدراسة بعناية فائقة بعد استجواب كل مريض استجواباً دقيقاً بناءً على الاستبيان التالي:

- **الاسم :** **العمر:**
- **الجنس :** **المهنة :**
- **العادات الشخصية (ممارسة الرياضة) :**
- **القصة العائلية (إصابة أحد أفراد العائلة بآفة مشابهة) :**
- **السوابق المرضية (أمراض تنقص المناعة) :**
- **وجود تعرق زائد:** **وجود حكة مرافقة :**
- **استخدام زيوت أو مرطبات جلدية :** **استخدام أدوية حالية :**
- **مكان الإصابة :** **التشخيص البدني :**
- **مكان أخذ العينة :** **توسفات من :**

نتيجة التحري الفطري المباشر :

نتيجة تلوين غرام :

نتيجة التلوين بزرقة الميتيلين :

طريقة أخذ العينات : تم أخذ العينات من الوسوف الجلدية في موقع الآفة من المرضى المشخص لديهم سريرياً نخالية مبرقشة باستخدام مشرط لحف الآفة.

التعامل مع العينات:

الخطوة الأولى :وضعنا جزءاً من الوسوف المأخوذة على سلايد أول وعاملنا تلك الوسوف مع KOH تركيز 30% (يلعب KOH دوراً رئيسياً في هضم الكيراتين المحيط بالفطور مما يمكن من رؤية الخيوط والأبواغ بشكل أوضح) وذلك بوضع قطرة على السلايد من KOH ووضع ساترة زجاجية عليها، ثم تعريض السلايد للهب خفيف أي تسخينه بشكل خفيف لتسريع الفحص بشكل دقيق (يجب تجنب التسخين الزائد حتى لاتتكون أشياء تعيق الرؤية وتؤدي إلى الالتباس عند شخص غير خبير) ومن ثم ترك السلايد لمدة لا تقل عن خمس دقائق قبل إجراء الفحص المجهري.

وتم إجراء الفحص المجهري المباشر بالمجهر الضوئي على التكبير 10 ثم التكبير 40 والتحري عن الخمائر والخيوط الفطرية في العينات الإيجابية.

الخطوة الثانية :وضعنا جزءاً آخر من الوسوف المأخوذة على سلايد ثاني من أجل تطبيق تلوين غرام، وتم إجراء ما يلي:

- وضعنا عدة قطرات من الكحول على السلايد لتثبيت الوسوف وتركه لمدة دقيقة إلى دقيقتين.
- بعد جفاف الكحول وضعنا عدة قطرات من الكزيلول باستخدام ممص باستور(لتشفيف الوسوف) وتركه كحد أقصى 3 دقائق(وذلك حسب طريقة مجربة في مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب البشري جامعة دمشق لتحضير محضرات ملونة من وسوف النخالية المبرقشة، وقد أعطت هذه الطريقة نتائج مجدية وتم استخدامها في العديد من مخابر الأحياء الدقيقة).
- بعد تثبيت الوسوف وتشفيفها لوناها بتلوين غرام بالطريقة التالية حسب

تعليمات الشركة المصنعة:

1- يغمر السلايد بمحلول البنفسجية المتبلورة لمدة 60 ثانية .
2- يشطف الملون السابق بالماء النظيف ثم يغمر السلايد بالمحلول اليودي لمدة 60 ثانية.
3- يشطف المحلول اليودي بالماء النظيف ثم يضاف مزيل اللون(أسيتون 25 % إيتانول 75 %) ويترك لمدة دقيقة.
4- يشطف السلايد بالماء النظيف ثم يغمر بمحلول الفوكسين الممدد (نسبة 1\10ماء مقطر).
5- يشطف الملون السابق بالماء النظيف ثم يترك السلايد ليجف ويتم فحصه مجهرياً.

تم أخذ السلايد الملون بغرام وفحص المحضر على العدسة الغاطسة100 بعد وضع قطرة من زيت الأرز على السلايد ورؤية الخمائر الفطرية الأرجوانية(البنفسجية) التي كانت مصطفة في عناقيد في أغلب محضرات دراستنا بالإضافة إلى الخيوط الفطرية القصيرة الأرجوانية الغامقة في عينات النخالية المبرقشة إيجابية التلوين.

وتم تلوين الوسوف أيضاً على السلايد الثالث بزرقة الميتيلين وذلك بعد تثبيت الوسوف بالكحول وتشفيفها بالكزيلول كما ذكر سابقاً، ثم وضع بضع قطرات من زرقة الميتيلين عليها وتركها لمدة دقيقتين، ثم غسيل السلايد بالماء النظيف وترك المحضر ليجف، وتم الفحص على العدسة الغاطسة 100 بعد وضع قطرة من زيت الأرز على السلايد، ورؤية الخمائر والأبواغ باللون الأزرق.

وفيما يلي صور توضح طريقة العمل المخبري لتلوين العينات :

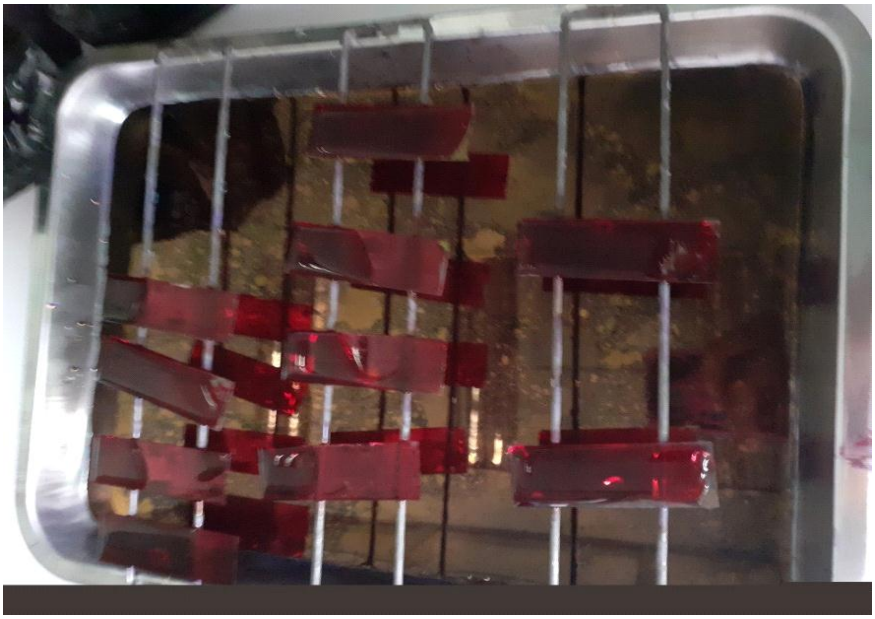
الشكل(5) الخطوة (1) تثبيت الوسوف بالكحول

الشكل (6) الخطوة (2) تشفيف الوسوف بالكزيلول

الشكل(7) الخطوة (3) بنفسجية الجانسيان

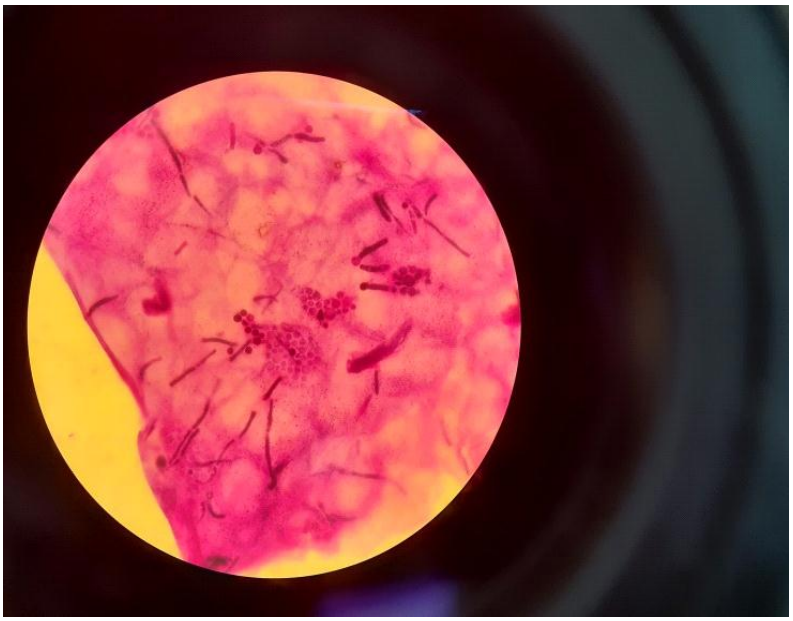
الشكل (8) الخطوة (4) اللوغول اليودي

الشكل (9) الخطوة (5) مزيل اللون

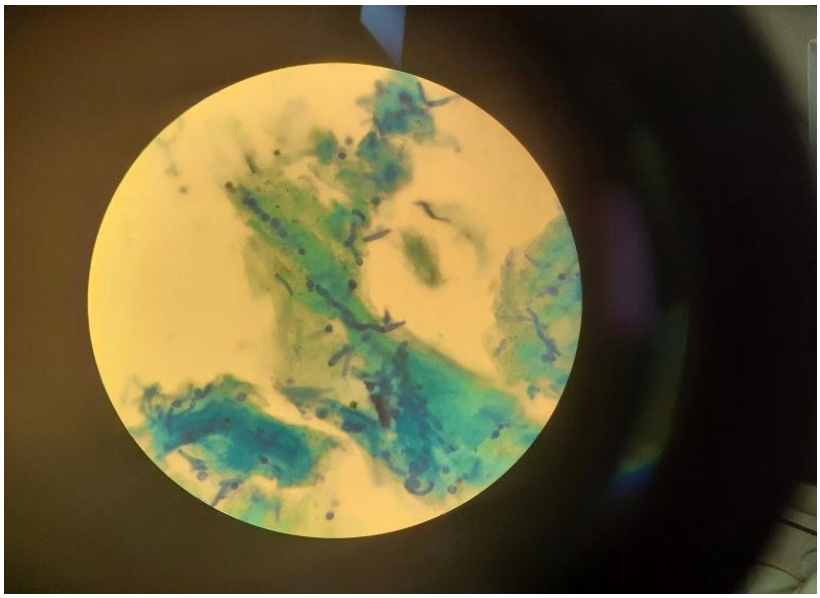


الشكل (10) الخطوة (6) الفوكسين المدد

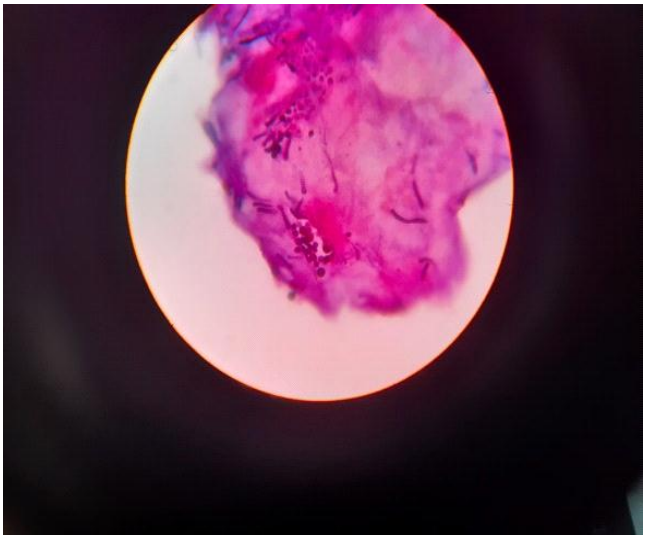
بعض الصور المجهرية للتلوين الذي تم إجراؤه على مرضى الدراسة:



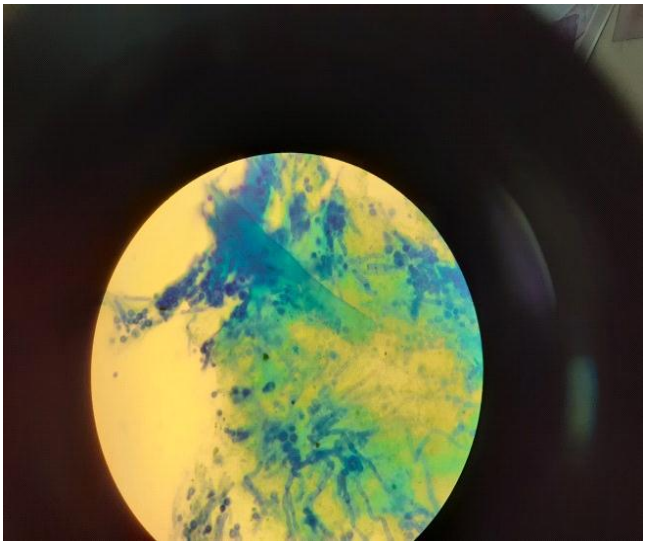
الشكل (11) تلوين غرام للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(1)



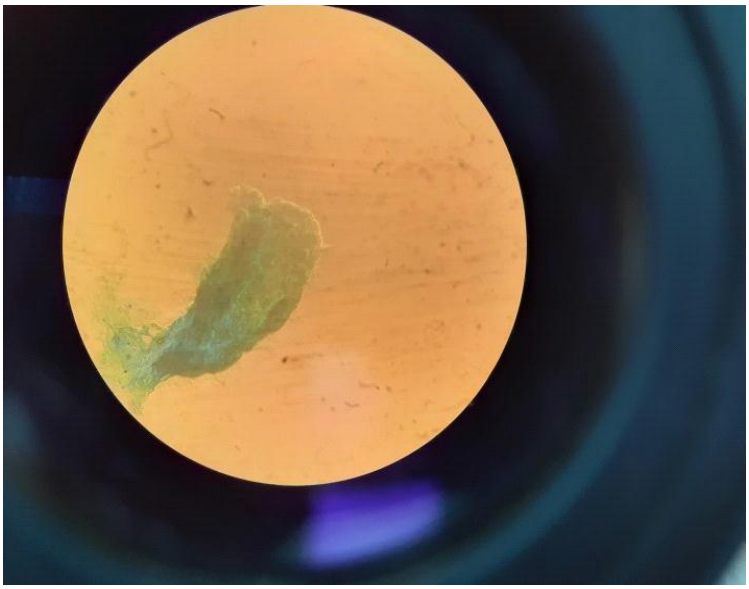
الشكل (12) تلوين زرقة الميتيلين للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(1)



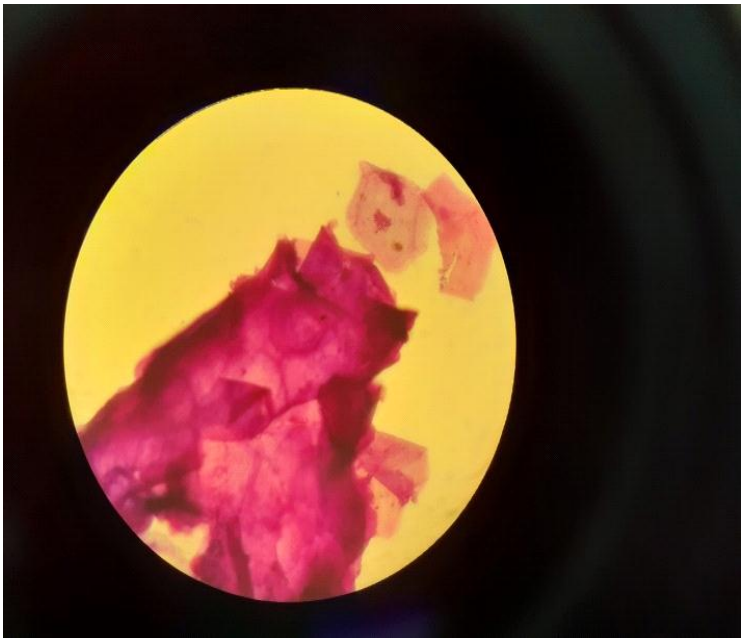
الشكل (13) تلوين غرام
للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(2)



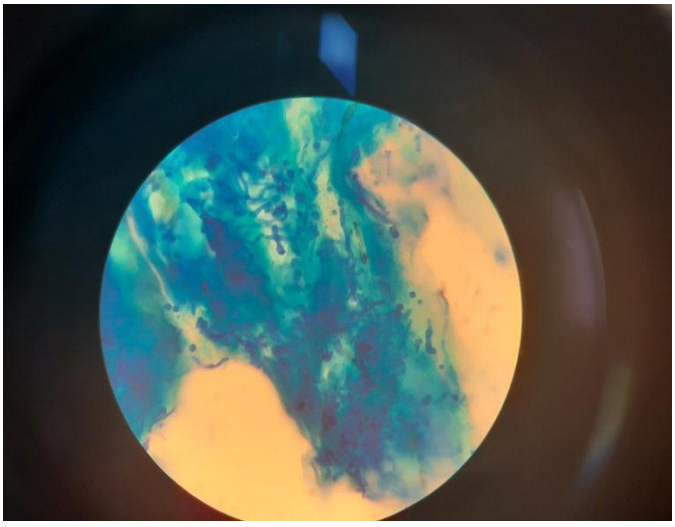
الشكل (14) تلوين زرقة الميتيلين
للوسوف إيجابي على عدسة 100 مريض (2)



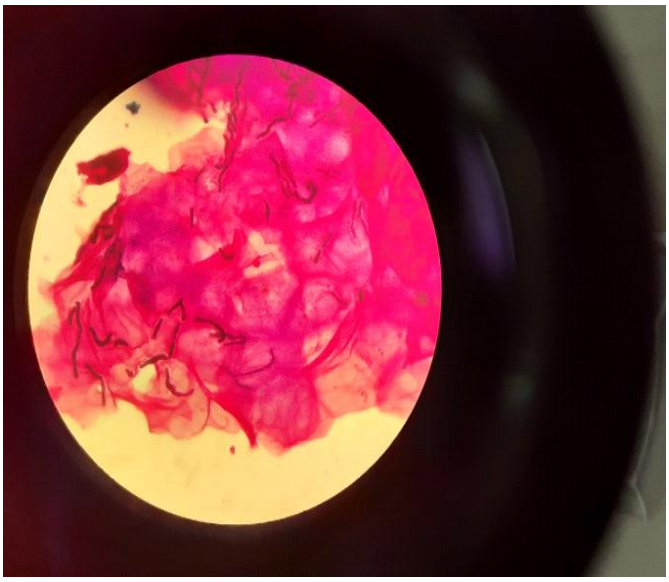
الشكل (15) تلوين زرقة الميتيلين
للوسوف سلبي مريض(3)



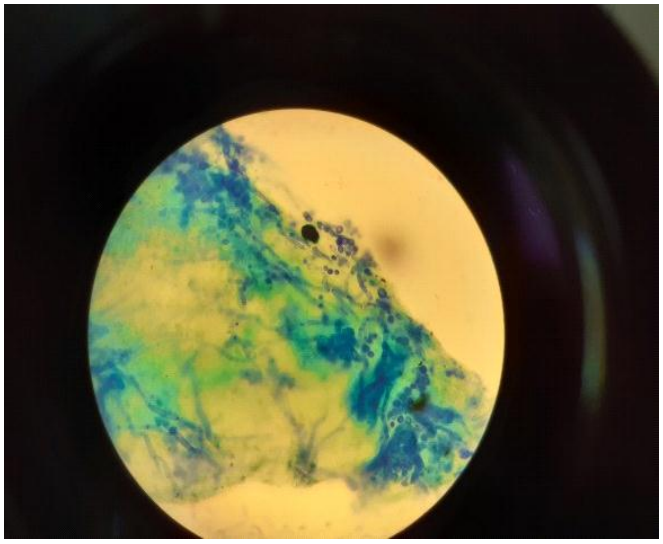
الشكل (16) تلوين غرام
للوسوف سلبي مريض(3)



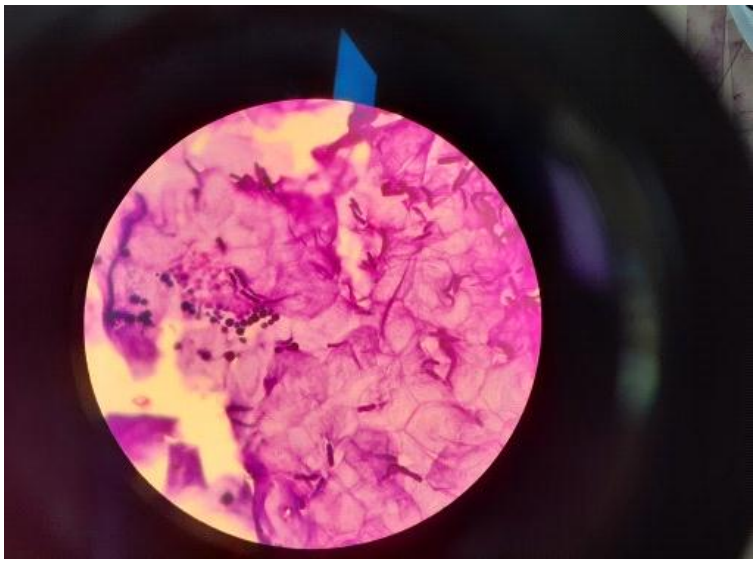
الشكل (17) تلوين زرقة الميتيلين
للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(4)



الشكل (18) تلوين غرام
للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(4)



الشكل (19) تلوين زرقة الميتيلين
للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(5)



الشكل (20) تلوين غرام

للوسوف إيجابي على العدسة 100 مريض(5)

4- النتائج والتحليل الإحصائي:

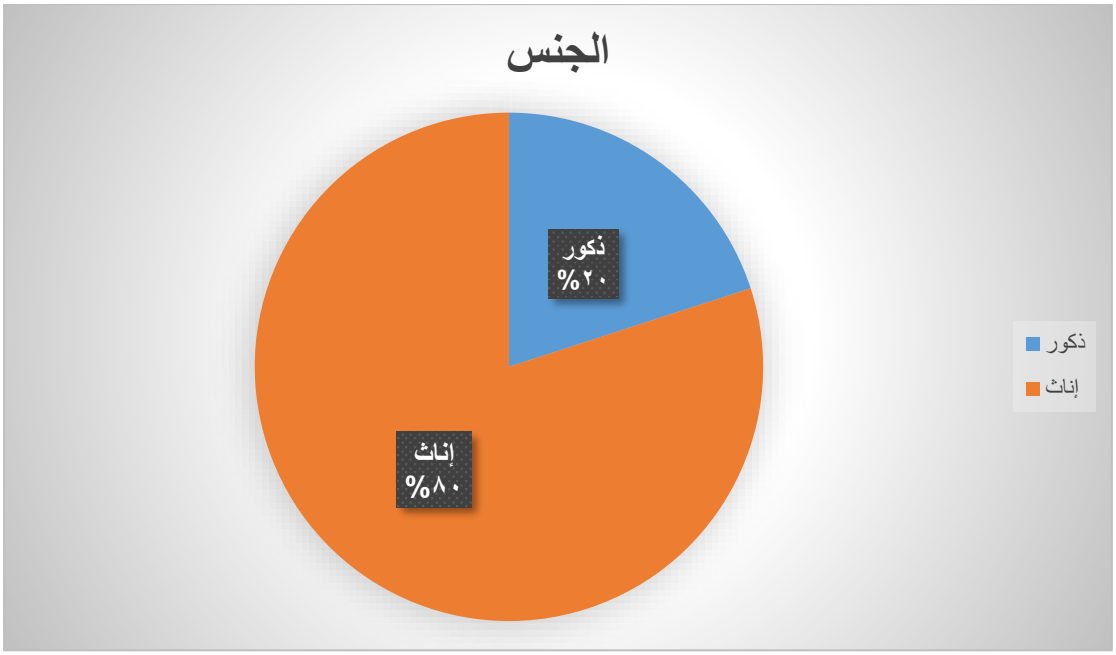
تمت مقاربة النتائج والتحليل الإحصائي باستخدام البرنامج الإحصائي ***IBM SPSS Statistics version 25*** وتم رسم الجداول والأشكال البيانية باستخدام برنامج ***Microsoft Excel*** وبرنامج ***Microsoft Word*** .

توزع العينة حسب الجنس :

شملت الدراسة 10 ذكور و 41 أنثى كما بين الجدول:

الجنس	العدد	النسبة
ذكور	10	%19.6
إناث	41	%80.4
المجموع	51	%100

جدول رقم (3) : توزع العينة بحسب الجنس



شكل رقم (21) يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب الجنس

توزع العينة حسب العمر :

تراوحت أعمار المرضى الداخلين بالدراسة بين16 سنة إلى 42 سنة، بمتوسط حسابي 29.55 كما بين الجدول التالي:

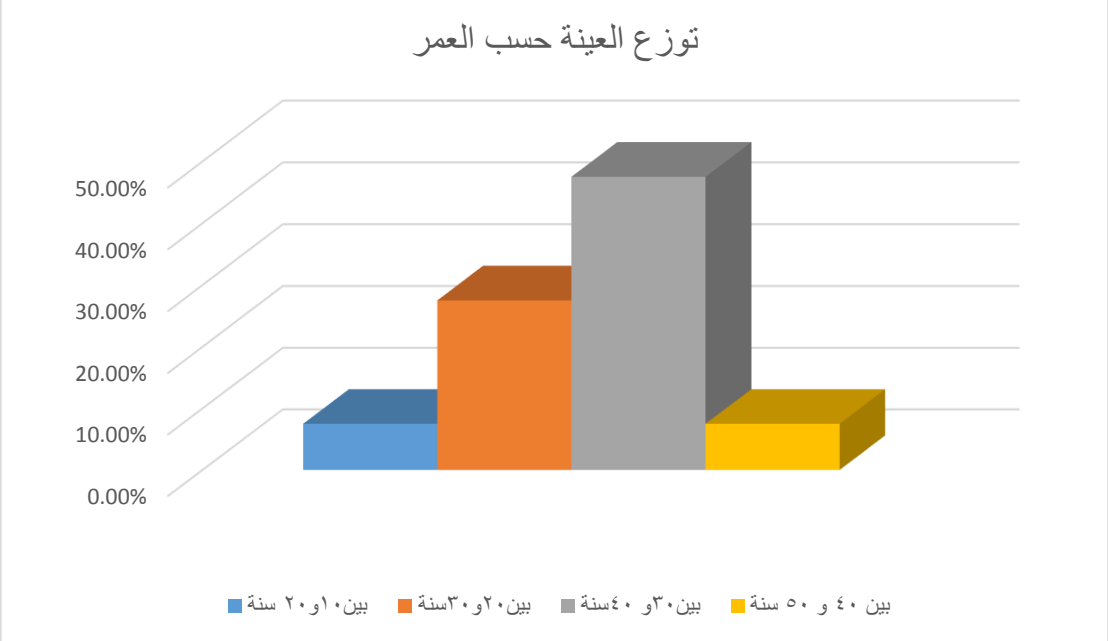
المتوسط	29.55
الانحراف المعياري	7.35
القيمة العليا	42
القيمة الصغرى	14

جدول رقم (4) :المتوسط الحسابي والانحراف المعياري للأعمار (بالسنوات) والقيمة العليا والصغرى لمرضى دراستنا

المجالات العمرية بالسنوات	العدد	النسبة
>=10 , >20	6	%11.8
>=20 , >30	16	%31.4
>=30 , >40	24	%47.1
>=40 , >50	5	%9.8
المجموع	51	%100

جدول رقم (5) : توزع العينات حسب الفئات العمرية في دراستنا

نلاحظ أن الفئة العمرية الأكثر عدداً هي الفئة العمرية بين (30-4) سنة والفئة العمرية الأقل عدداً هي الفئة العمرية بين (40-50) سنة.



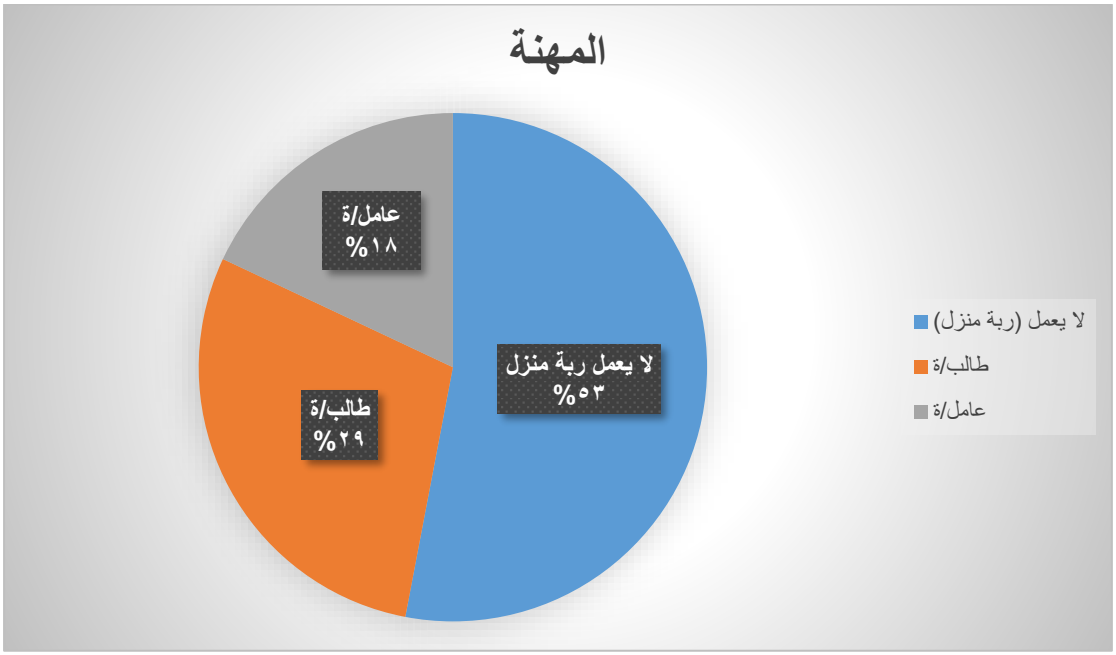
شكل رقم (22) يوضح النسبة المئوية لعدد العينات حسب الفئات العمرية في دراستنا

توزع العينة حسب المهنة:

جاءت نتائج دراستنا كالتالي : عدد المرضى العاملين (طالب أو عامل) الداخلين في الدراسة 24 ، ويشكلون نسبة 47% من مجمل عدد المرضى، وعدد المرضى غير العاملين27 ، وهم يشكلون نسبة 53% من مجمل عدد المرضى.

المهنة	العدد	النسبة
لا يعمل (ربة منزل)	27	%53
طالب/ة	15	%29.4
عامل/ة	9	%17.6
المجموع	51	%100

جدول رقم (6): توزع العينة حسب المهنة



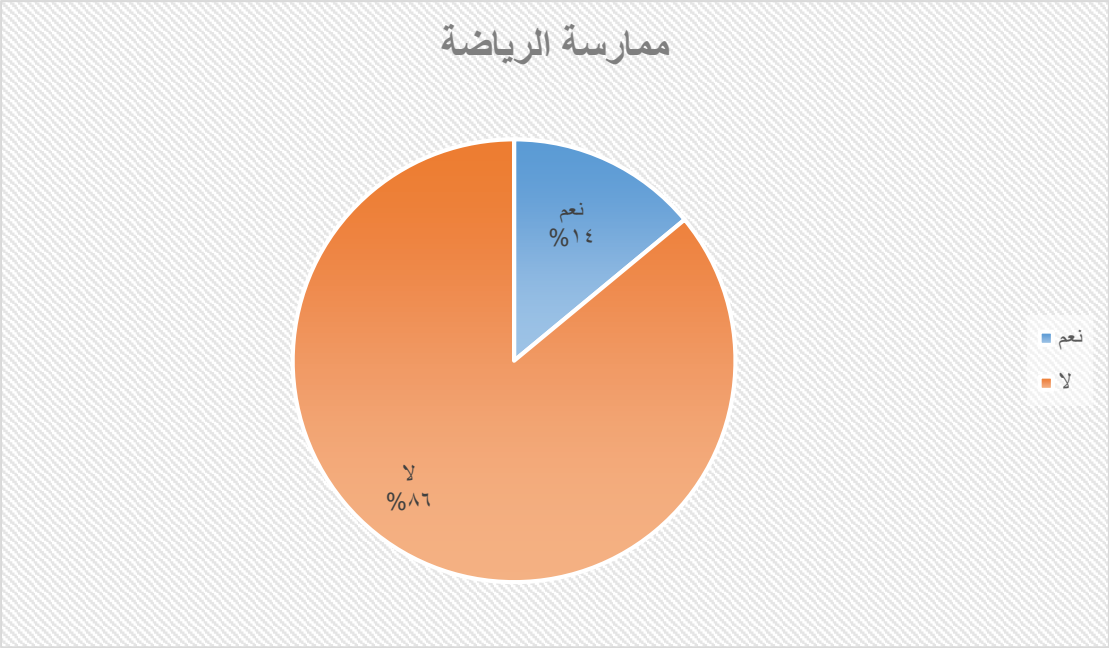
شكل رقم (23) يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب المهنة

توزع العينة حسب ممارسة الرياضة:

شملت دراستنا 44 شخص لا يمارسون الرياضة بنسبة 86.3% ، ونسبة الممارسين للرياضة 13.7% من مجمل عدد المرضى.

ممارسة الرياضة	العدد	النسبة
نعم	7	%13.7
لا	44	%86.3
المجموع	51	%100

جدول رقم (7) : توزع العينة حسب ممارسة الرياضة



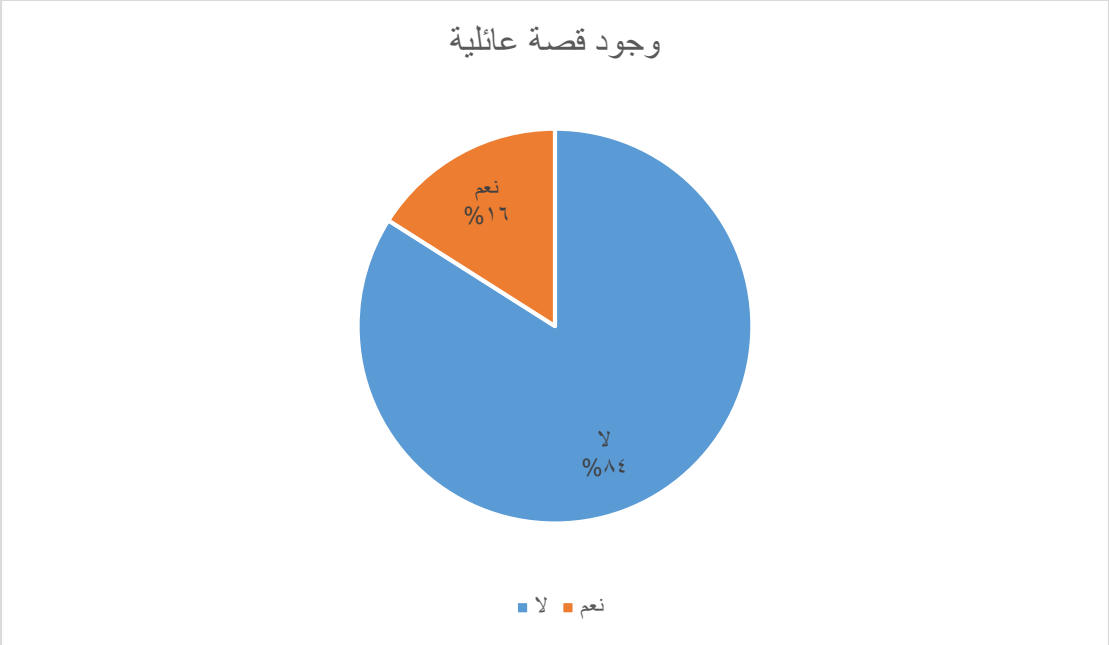
شكل رقم (24) :يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب ممارسة الرياضة

توزع العينة حسب وجود قصة عائلية :

شملت دراستنا 8 مرضى ممن لديهم قصة عائلية للنخالية المبرقشة ويشكلون نسبة 15.7% من مرضى الدراسة.

وجود قصة عائلية	العدد	النسبة
نعم	8	%15.7
لا	43	%84.3
المجموع	51	%100

جدول رقم :(8) توزع العينة حسب وجود قصة عائلية



شكل رقم (25) :يبين النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب وجود قصة عائلية

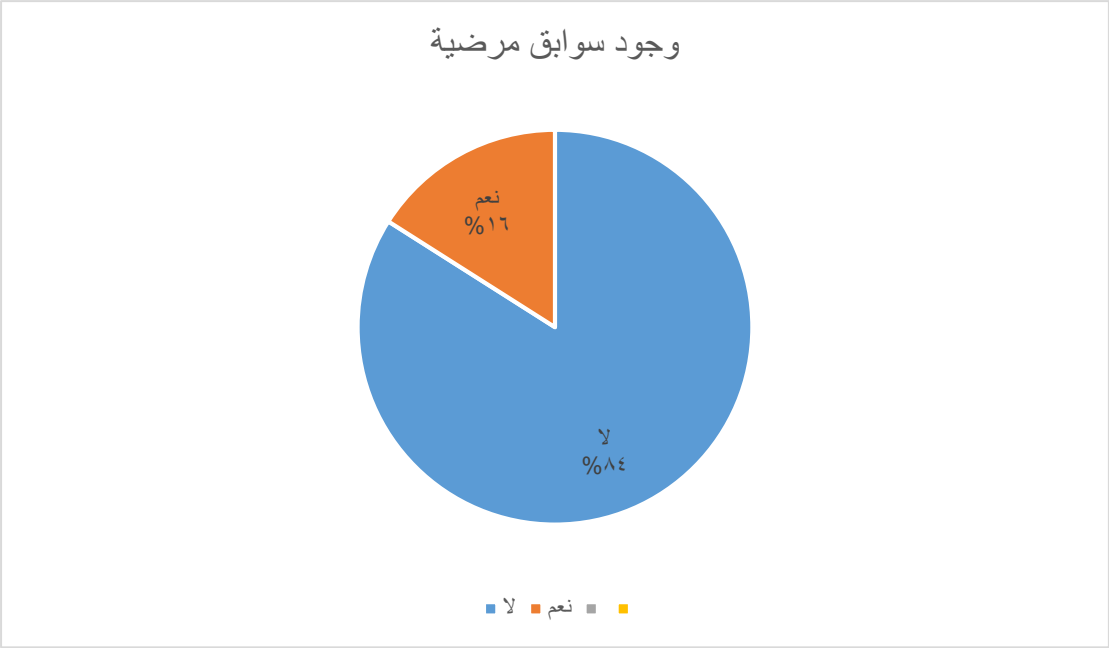
توزع العينة حسب وجود سوابق مرضية مناعية:

شملت دراستنا 51 مريض ووجدت السوابق المرضية عند 8 مرضى منهم، وهم يشكلون 15.7% من مرضى الدراسة .

وجود سوابق مرضية مناعية	العدد	النسبة

نعم	8	%15.7
لا	43	%84.3
المجموع	51	%100

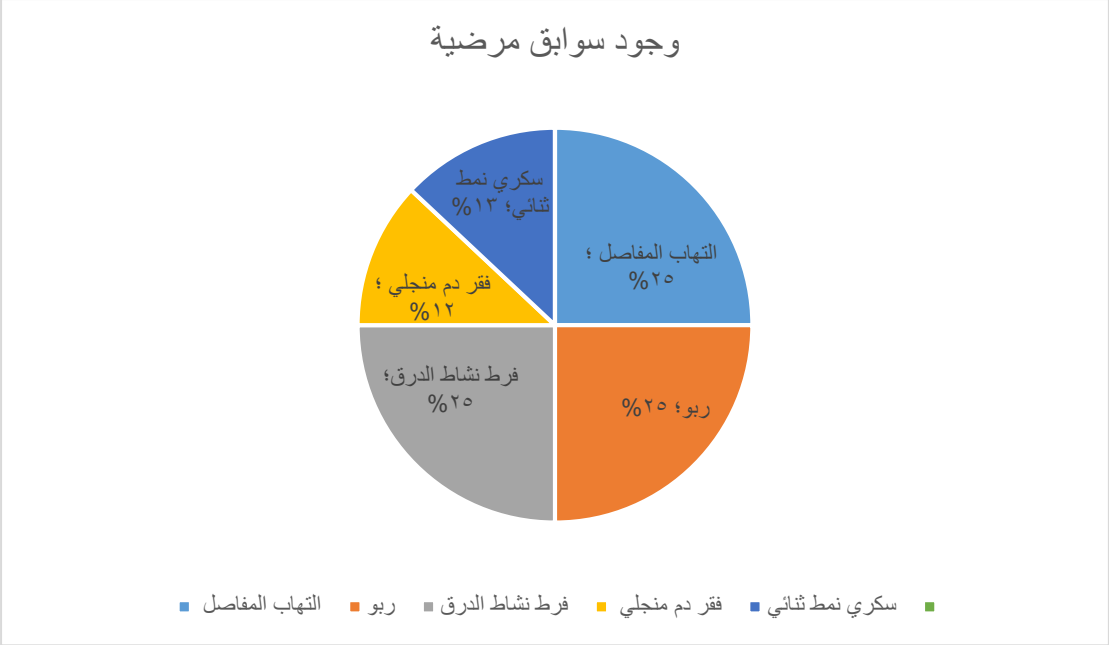
جدول رقم :(9) توزع العينة حسب وجود سوابق مرضية أو مناعية



شكل رقم (26) : يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب وجود سوابق مرضية أو مناعية

	العدد	النسبة
التهاب مفاصل	2	%25
ربو	2	%25
فرط نشاط درق	2	%25
فقر دم منجلي	1	%12.5
سكري نمط ثاني	1	%12.5
المجموع	8	%100

جدول رقم (10) : توزع السوابق المرضية عند مرضى دراستنا



شكل رقم (27) يوضح النسبة المئوية لتوزع السوابق المرضية عند مرضى دراستنا

توزع العينة حسب وجود تعرق زائد :

شكل المرضى الذين لديهم تعرق مفرط النسبة الأكبر من مرضى الدراسة 90.2%

كما يبين الجدول التالي :

وجود تعرق زائد	العدد	النسبة
نعم	46	%90.2
لا	5	%9.8
المجموع	51	%100

جدول رقم (11) : توزع العينة حسب وجود تعرق زائد

شكل رقم (28) : يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب وجود تعرق زائد

توزع العينة حسب وجود حكة :

أظهرت نتائج دراستنا أن عدد مرضى النخالية المبرقشة الذين وجد عندهم حكة 14، وهم يشكلون نسبة 27.5% من مجمل عدد المرضى، ولم تكن الحكة موجودة عند أغلب مرضى دراستنا وبلغ عدد المرضى الذين لم توجد لديهم حكة 37 ويشكلون نسبة 72.5% من مجمل عدد المرضى.

وجود حكة	العدد	النسبة
نعم	14	%27.5
لا	37	%72.5
المجموع	51	%100

جدول رقم (12) : توزع العينة حسب وجود الحكة

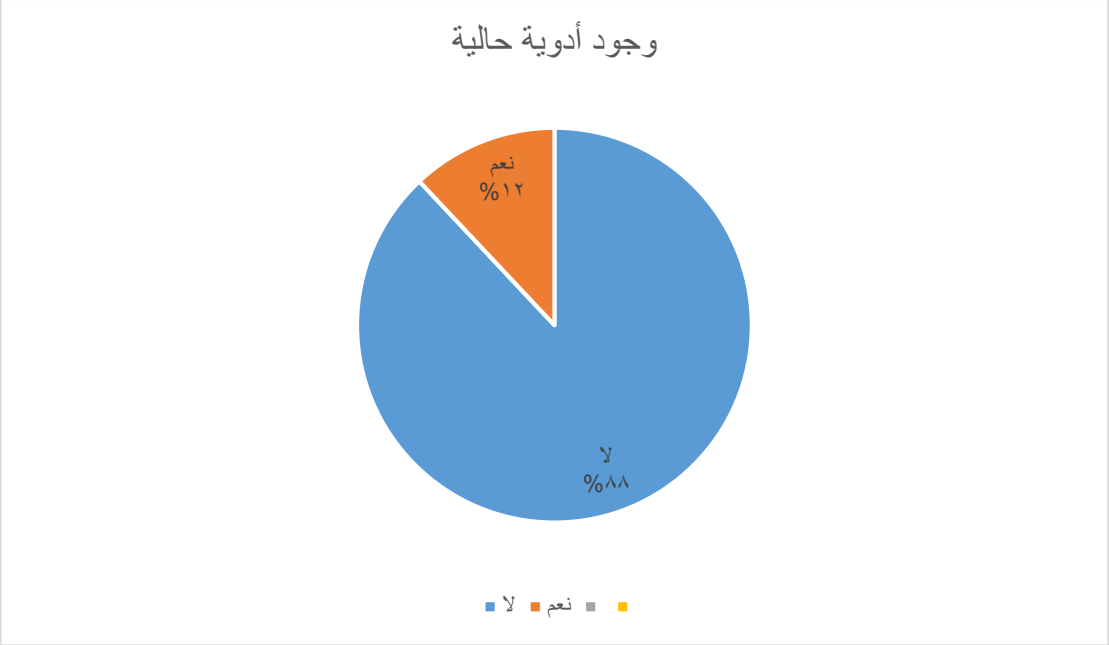
شكل رقم (29) : يبين النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب وجود حكة

توزع العينة حسب وجود أدوية حالية:

بلغ عدد مرضى دراستنا الذين يتناولون أدوية حالية (خاصة ستيروئدات) 6 مرضى، ويشكلون 11.8% من مجمل عدد المرضى.

وجود أدوية حالية	العدد	النسبة
نعم (ستيروئيدات)	6	%11.8
لا	45	%88.2
المجموع	51	%100

جدول رقم (13) : توزع العينة حسب وجود أدوية حالية(ستيروئيدات)



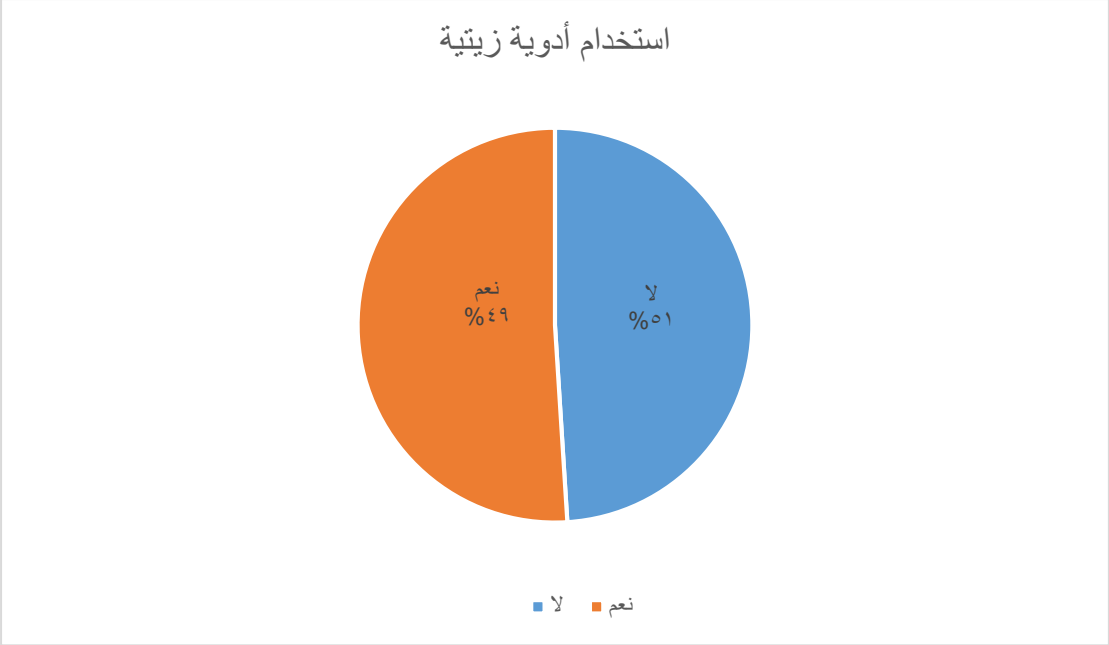
شكل رقم (30) : يوضح النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب تناول أدوية حالية(ستيروئيدات)

توزع العينة حسب استخدام أدوية زيتية أو مرطبات جلدية:

بلغ عدد مرضى النخالية المبرقشة المستخدمين لزيوت أو مرطبات جلدية في دراستنا 25 مريض، ويشكلون 49% من مجمل عدد المرضى.

استخدام أدوية زيتية أومرطبات جلدية	العدد	النسبة
نعم	25	%49
لا	26	%51
المجموع	51	%100

جدول رقم (14) : توزع العينة حسب استخدام أدوية زيتية أو مرطبات جلدية



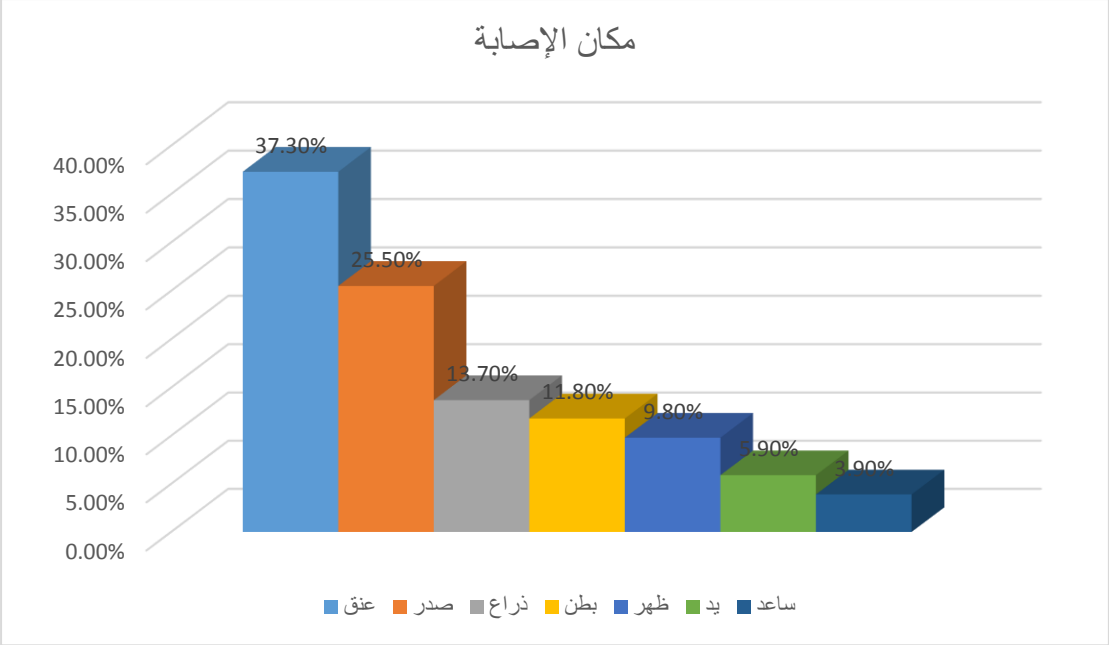
شكل رقم (31) : يبين النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب استخدام أدوية زيتية أو مرطبات

توزع العينة حسب مكان الإصابة :

شكلت إصابة العنق النسبة الأكبر لمكان الإصابة عند مرضى دراستنا 37.3% من مجمل عدد المرضى تليه إصابة الصدر التي شكلت 19.6% من مرضى الدراسة وذلك موضح في الجدول التالي:

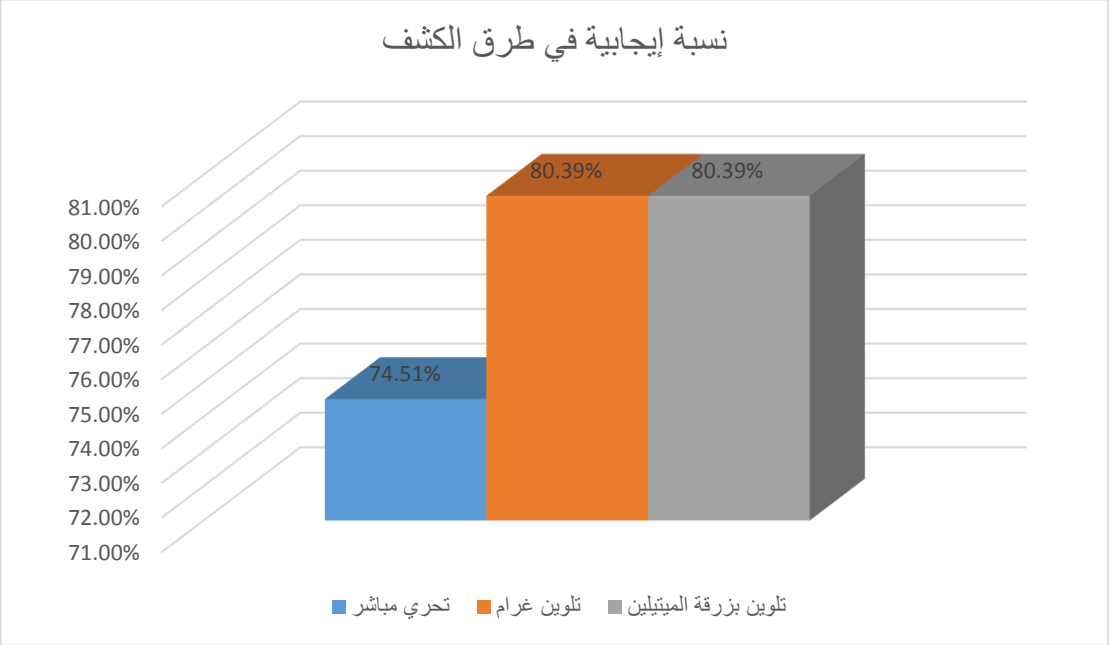
	العدد	النسبة
عنق	19	%37.3
صدر	10	%19.6
ذراع	7	%13.7
بطن	6	%11.8
ظهر	4	%7.8
يد	3	5.95
ساعد	2	%3.9
المجموع	51	%100

جدول رقم (15) : توزع العينة حسب مكان الإصابة



شكل رقم (32) : يبين النسبة المئوية لمرضى عينة البحث حسب مكان الإصابة

بلغ عدد العينات الإيجابية في التحري المباشر 38 أي بنسبة(74.51%) ، وبلغ عدد العينات الإيجابية في كل من تلوين غرام وتلوين زرقة الميتيلين 41 أي بنسبة (80.39%).



شكل رقم (33) : يبين النسبة المئوية للعينات الإيجابية حسب طريقة الكشف

المقارنة بين طريقة تلوين غرام والتلوين بزرقة الميتلين:

طريقة الكشف	تلوين غرام		
	النتيجة	إيجابي	سلبي	المجموع
زرقة الميتلين	إيجابي	41	0	41
	سلبي	0	10	10
	المجموع	41	10	51

جدول رقم (16) : نتائج تلوين غرام والتلوين بزرقة الميتلين لعينات مرضى الدراسة

نلاحظ وجود تطابق تام بين نتائج طريقتي التلوين وبالتالي سنقوم بدراستهما سوياً لأن الموجودات التي تنطبق على إحداهما تنطبق على الأخرى.

المقارنة بين طريقة التحري المباشر وطريقتي التلوين:

طريقة الكشف	تلوين غرام وتلوين زرقة الميتلين			
	النتيجة	إيجابي	سلبي	المجموع
تحري مباشر	إيجابي	38(74.51%)	0(0%)	38(74.51%)
	سلبي	3(5.88%)	10(19.61%)	13(25.49%)
	المجموع	41(80.39%)	10(19.61%)	51(100%)

جدول رقم (17) : نتائج الكشف عن الفطر باستخدام طريقة التحري المباشر وطريقتي التلوين

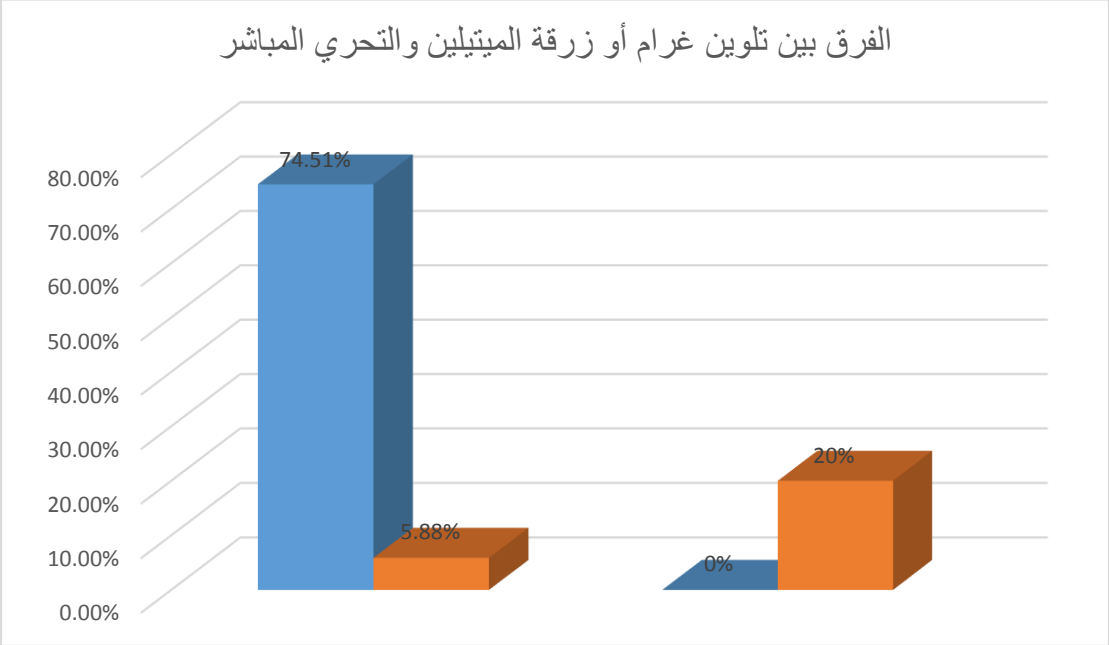
اعتمد على اعتبار النتيجة إيجابية حقيقية عند كون كلا الاختبارين أو أحدهما إيجابياً واعتبار النتيجة سلبية حقيقية عند كون كلا الاختبارين سلبياً.

ولدراسة وجود فرق بين التلوين والتحري المباشر تم إجراء اختبار***McNemar test*** وحساب الفرق بين قيمة حساسية الطريقتين 74.51% لطريقة التحري المباشر و 80.39% لطريقة تلوين غرام حسب الجدول السابق فكانت النتيجة:

$p-value=0.250>0.05$

وبالتالي رغم أن حساسية التلوين أعلى من حساسية التحري المباشر بقيمة بسيطة لكن لا يوجد فرق هام إحصائياً بينهما.

وبالتالي التحري عن الفطر بأي من الطرق الثلاثة السابقة لا يؤدي إلى تغير النتيجة بشكل هام.



	نتيجة التلوين إيجابية	نتيجة التلوين سلبية
نتيجة التحري المباشر إيجابية	%74,51	%0
نتيجة التحري المباشر سلبية	%5,88	%20

شكل رقم (34) : يوضح الفرق بين تلوين غرام أو زرقة الميتيلين والتحري المباشر

دراسة ارتباط العوامل السريرية مع نتيجة تلوين غرام:

أولاً :الارتباط مع الجنس:

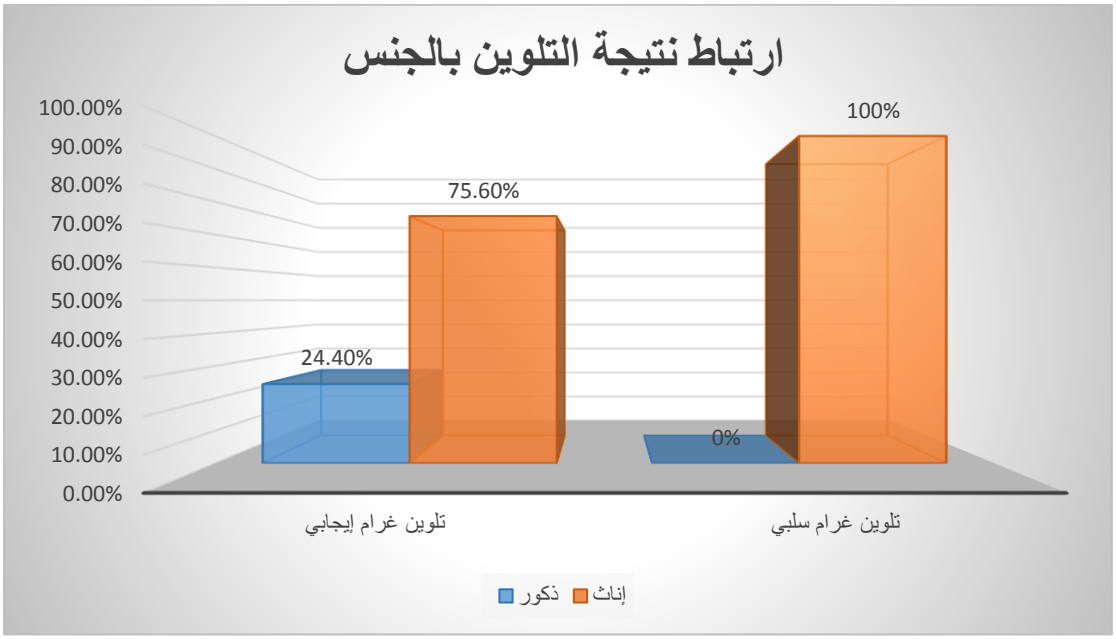
لوحظ أن نسبة الذكور الذين كان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (24.4) أعلى منها في العينات سلبية تلوين غرام (0%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
الجنس		إيجابي	سلبي	المجموع
	ذكر	10(%24.4)	0(%0)	10
	أنثى	31(%75.6)	10(%100)	41
	المجموع	41(%100)	10(%100)	51

جدول رقم (18) : توزع العينات حسب الجنس وفق نتائج تلوين غرام في دراستنا

p-value=0.178>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين الجنس وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة والجنس، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (35) : يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب الجنس وفق نتائج تلوين غرام

ثانياً :الارتباط مع العمر:

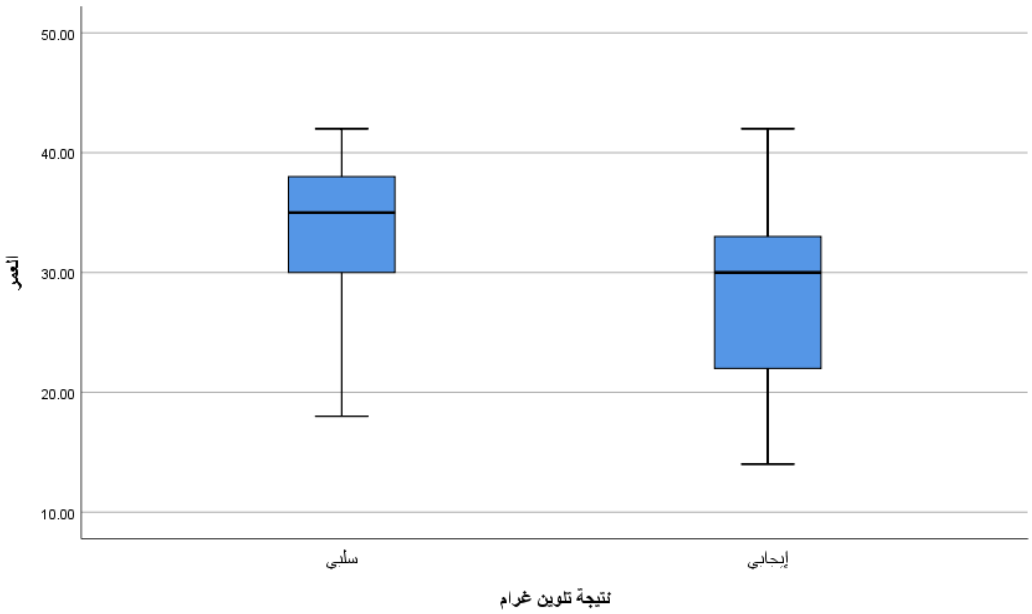
أشارت دراستنا إلى أن أعلى نسبة انتشار للنخالية المبرقشة كانت عند الفئة العمرية 30-40 سنة، ولوحظ أن متوسط العمر للمرضى الذين كان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (28.65) أصغر من متوسط عمر العينات سلبية غرام(33.2) ، ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار T-Test :

	نتيجة تلوين غرام	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري
العمر	إيجابي	41	28.65	7.24
	سلبي	10	33.2	6.99

جدول رقم (19) : نتائج تلوين غرام حسب المتوسط العمري لمرضى دراستنا

p-value= 0.08>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين العمر وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة وعمر المرضى.



شكل رقم (36) : يبين نتائج تلوين غرام حسب المتوسط العمري لمرضى الدراسة

ثالثاً : الارتباط مع المهنة:

لوحظ أن نسبة الذين المرضى الذين لا يعملون وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (46.3%) أصغر منها في العينات سلبية الغرام(80%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

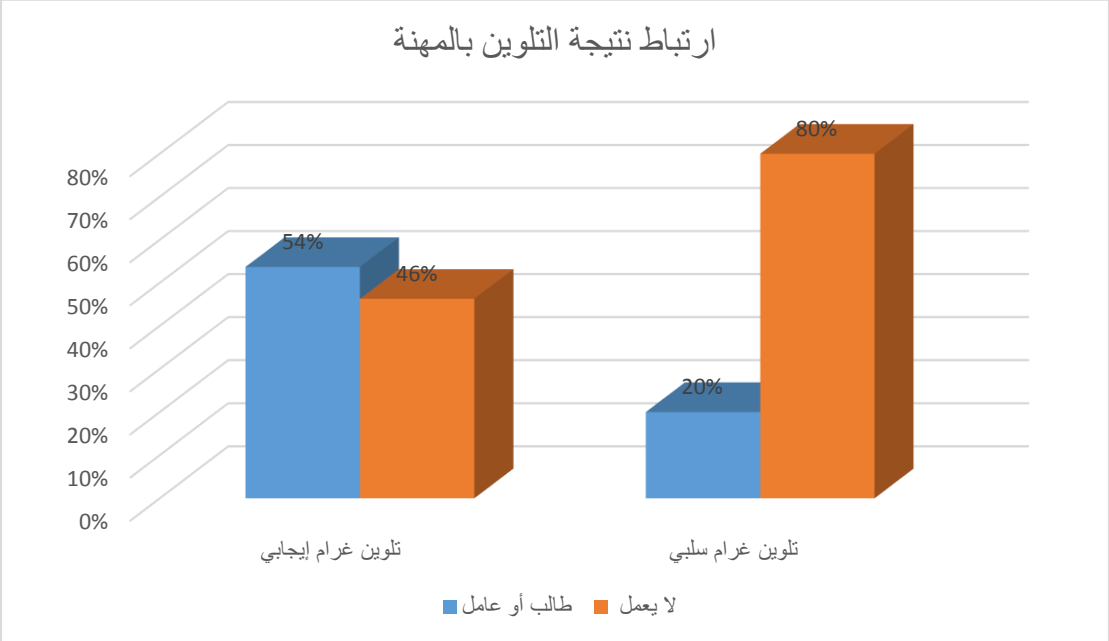
		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
المهنة	طالب أو عامل	(%53.7)22	(%20)2	24
	لا يعمل	(%46.3)19	(%80)8	27
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (20) : توزع العينات حسب المهنة وفق نتائج تلوين غرام

p-value=0.081>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين المهنة وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام،

والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (37) : يوضح النسبة المئوية لعينات المرضى حسب المهنة وفق نتائج تلوين غرام

رابعاً :الارتباط مع ممارسة الرياضة:

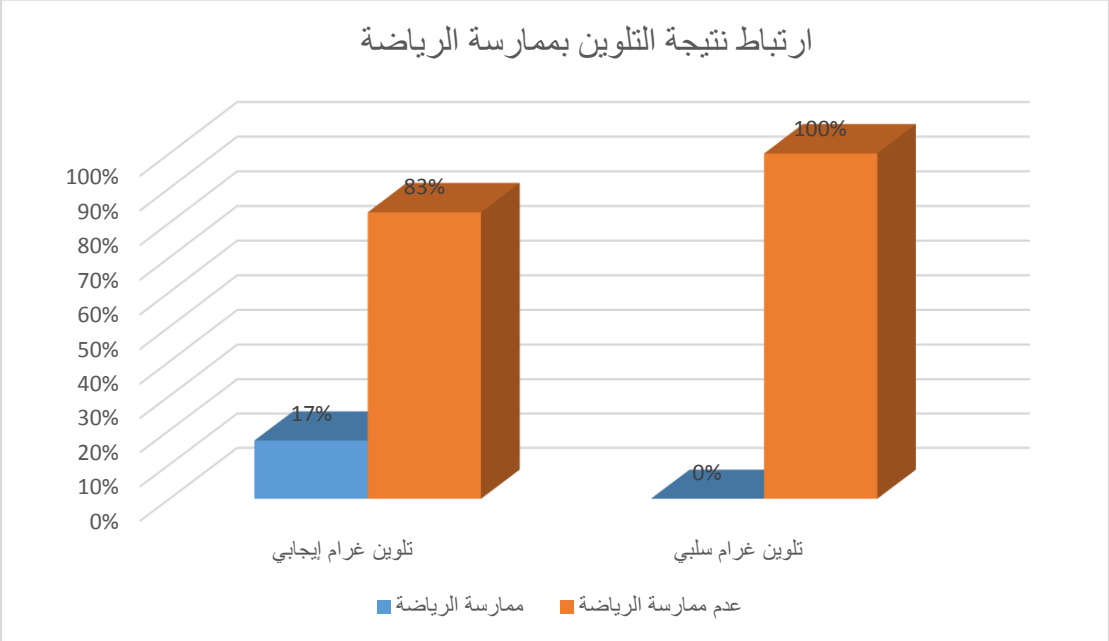
لوحظ أن نسبة المرضى الذين يمارسون الرياضة عند وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (17%) أكبر منها في العينات سلبية غرام (0%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
ممارسة الرياضة	نعم	(%17)7	(%0)0	7
	لا	(%83)34	(%100)10	44
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (21) : توزع العينات حسب ممارسة الرياضة وفق نتائج تلوين غرام

p-value=0.320>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين ممارسة الرياضة وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة وممارسة الرياضة، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (38) : يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب ممارسة الرياضة وفق نتائج تلوين غرام

خامساً :الارتباط مع وجود قصة عائلية:

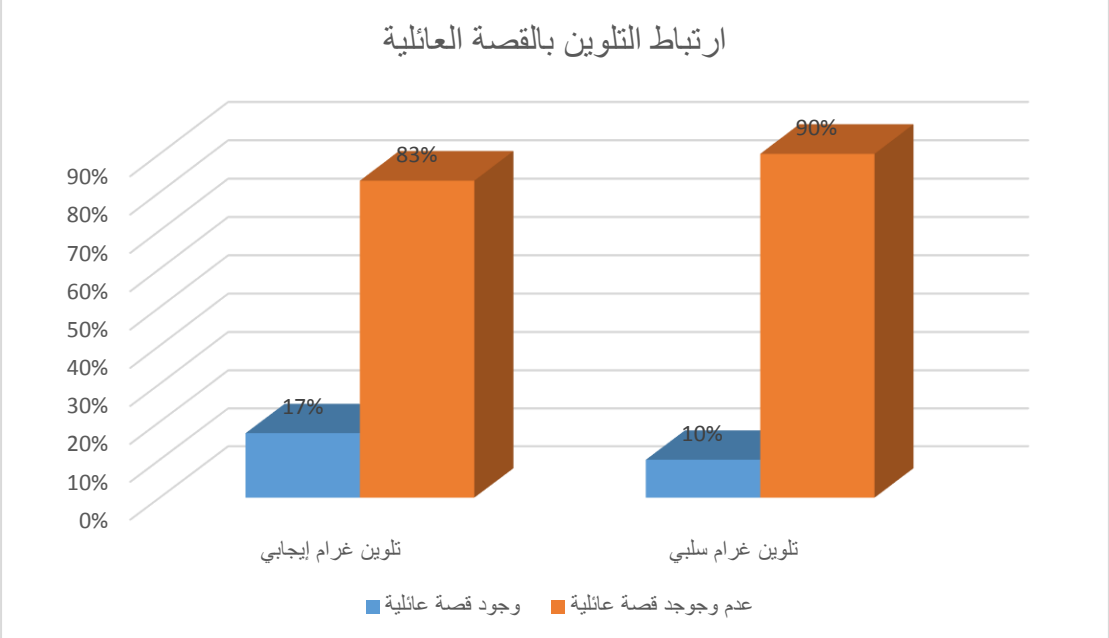
لوحظ أن نسبة المرضى الذين وجدت لديهم قصة عائلية وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (17%) أكبر منها في العينات سلبية غرام (10%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
القصة العائلية	يوجد	(%17)7	(%10)1	8
	لا يوجد	(%83)34	(%90)9	43
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم(22) : توزع العينات حسب وجود قصة عائلية وفق نتائج تلوين غرام لمرضى الدراسة

p-value=1>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين القصة العائلية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة ووجود قصة عائلية، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (39): يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب وجود قصة عائلية وفق نتائج تلوين غرام

سادساً :الارتباط مع وجود سوابق مرضية مناعية:

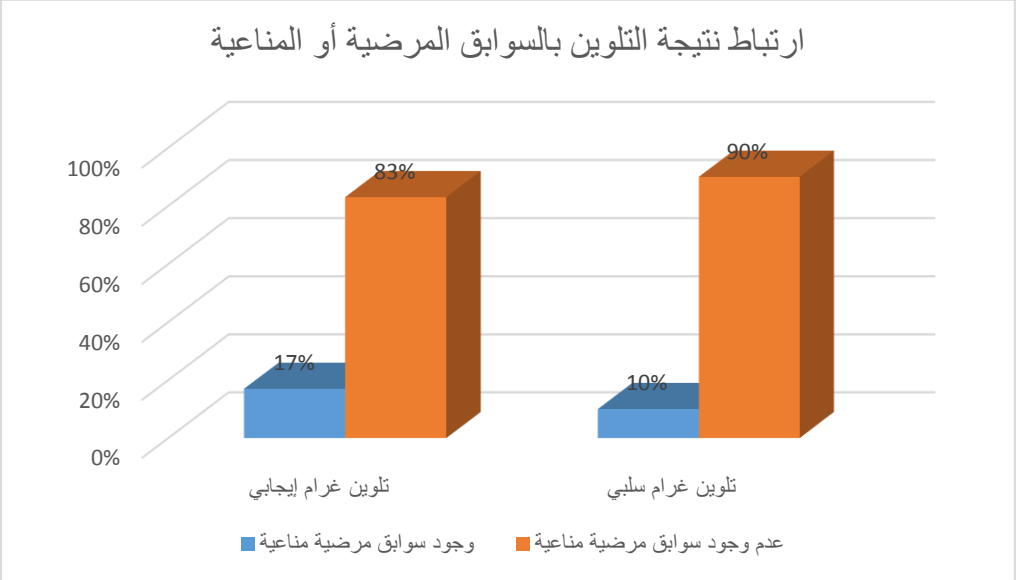
لوحظ أن نسبة الذين المرضى الذين وجد لديهم سوابق مرضية مناعية وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (17%) أكبر منها في العينات سلبية غرام (10%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
سوابق مرضية أو مناعية	يوجد	(%17)7	(%10)1	8
	لا يوجد	(%83)34	(%90)9	43
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (23) : توزع العينات حسب وجود سوابق مرضية أو مناعية وفق نتائج تلوين غرام لمرضى الدراسة

p-value=1>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين السوابق المرضية المناعية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة ووجود سوابق مرضية أو مناعية عند المرضى، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (40) : يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب وجود سوابق مرضية أو مناعية وفق نتائج تلوين غرام

سابعاً :الارتباط مع وجود تعرق زائد:

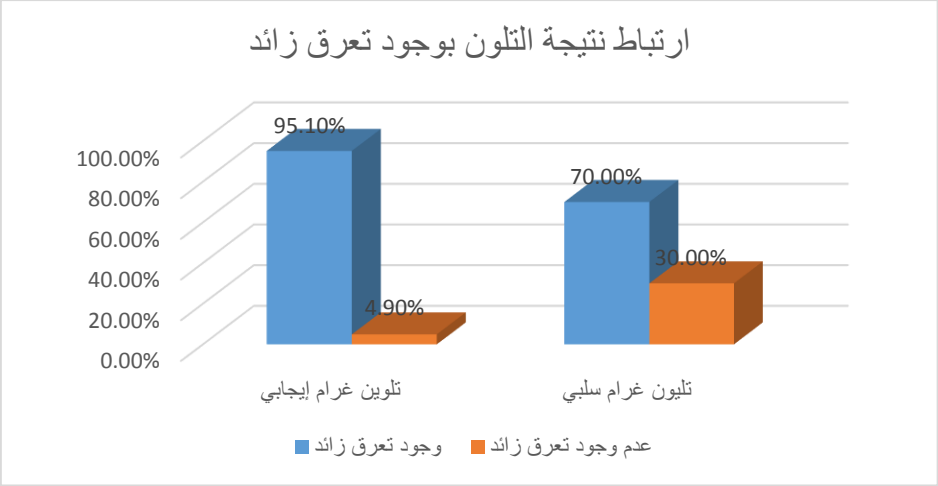
لوحظ أن نسبة المرضى الذين لديهم تعرق زائد وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (95.1%) أكبر منها في العينات سلبية غرام (70%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
تعرق زائد	يوجد	(%95.1)39	(%70)7	46
	لا يوجد	(%4.9)2	(%30)3	5
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (24) : توزع العينات حسب وجود تعرق زائد وفق نتائج تلوين غرام لمرضى دراستنا

p-value=0.083>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين وجود التعرق الزائد وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة ووجود تعرق مفرط عند المرضى، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (41) يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب وجود تعرق زائد لديهم وفق نتائج تلوين غرام

ثامناً :الارتباط مع وجود حكة:

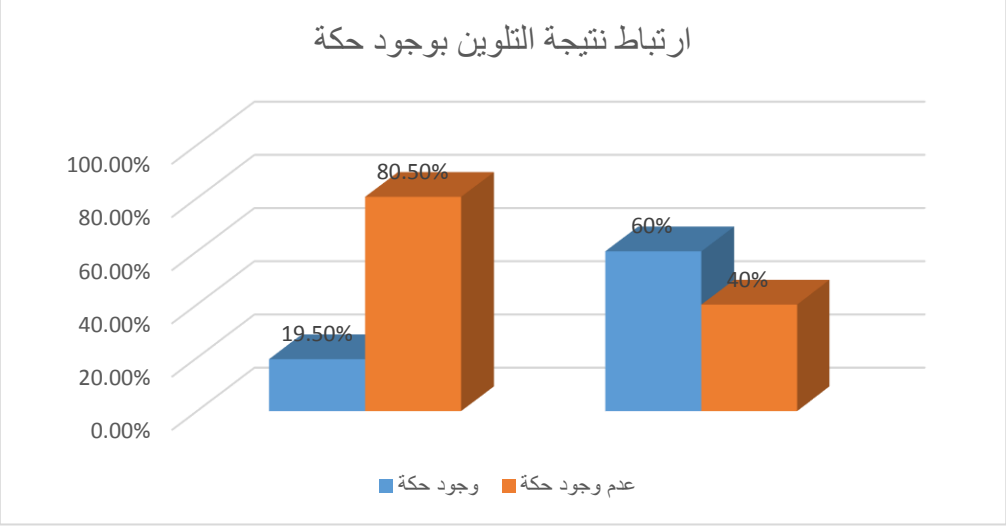
لوحظ أن نسبة المرضى الذين لديهم حكة وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (19.5%) أصغر منها في العينات سلبية غرام (60%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
الحكة	يوجد	(%19.5)8	(%60)6	14
	لا يوجد	(%80.5)33	(%40)4	37
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (25) : توزع العينات حسب وجود حكة وفق نتائج تلوين غرام لمرضى دراستنا

p-value=0.018<0.05

وبالتالي يوجد ارتباط بين وجود الحكة وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام، حيث أن وجود الحكة أثر سلباً على طريقة التحري، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (42) يبين النسبة المئوية لعينات المرضى حسب وجود حكة وفق نتائج تلوين غرام

تاسعاً :الارتباط مع وجود أدوية حالية:

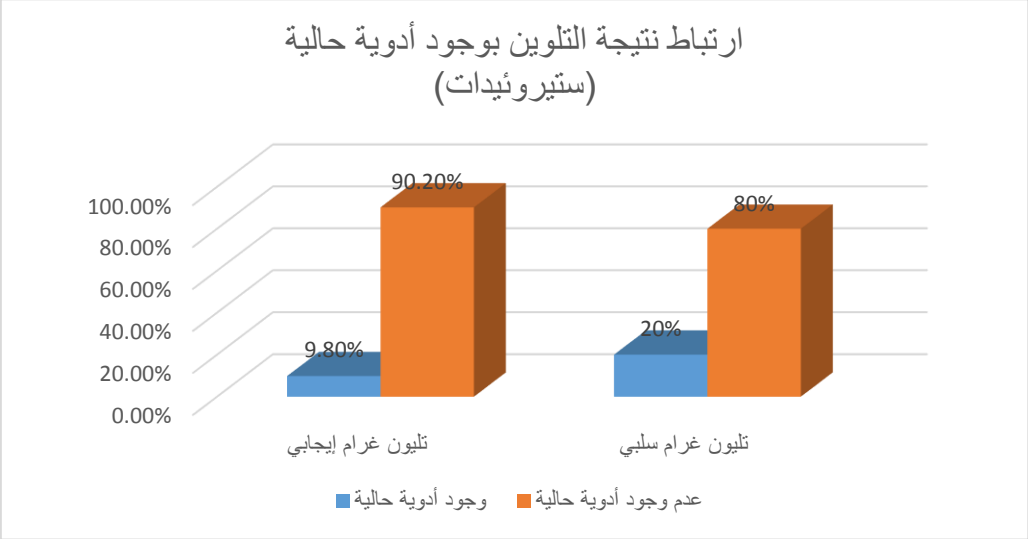
لوحظ أن نسبة المرضى الذين يتناولون أدوية حالية(ستيروئيدية) وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (9.8%) أصغر منها في العينات سلبية غرام (20%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
أدوية حالية	يوجد (ستيروئيدات)	(%9.8)4	(%20)2	6
	لا يوجد	(%90.2)37	(%80)8	45
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (26) :توزع العينات حسب تناول أدوية حالية(ستيروئيدات)وفق نتائج تلوين غرام لمرضى دراستنا

p-value=0.584>0.05

وبالتالي لا يوجد ارتباط بين تناول الأدوية الستيروئيدية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة وتناول الأدوية الستيروئيدية، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (43) يوضح النسبة المئوية لعينات المرضى حسب تناولهم أدوية ستيروئيدية وفق نتائج تلوين غرام

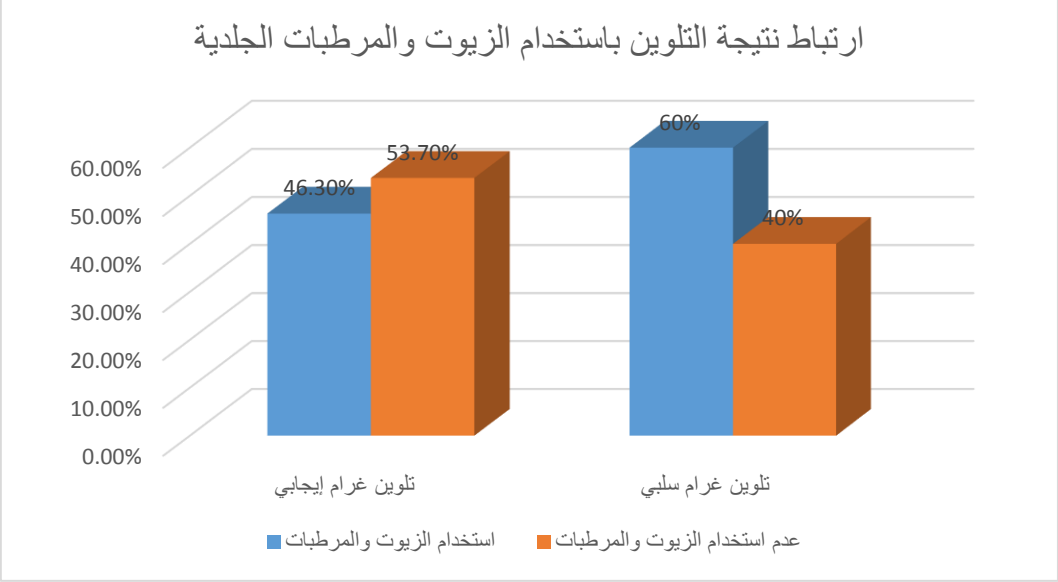
عاشراً :الارتباط مع استخدام الزيوت أو المرطبات الجلدية:

لوحظ أن نسبة المرضى الذين يستخدمون زيوت أو مرطبات جلدية وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم (46.3%) أصغر منها في العينات سلبية غرام (60%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار ***Fisher's Exact Test*** :

		تلوين غرام		
		إيجابي	سلبي	المجموع
استخدام زيوت أو مرطبات جلدية	نعم	(%46.4)19	(%60)6	25
	لا	(%53.7)22	(%40)4	26
	المجموع	(%100)41	(%100)10	51

جدول رقم (27) : توزع العينات حسب استخدام زيوت أو مرطبات جلدية وفق نتائج تلوين غرام لمرضى دراستنا

p-value=0.499>0.05 وبالتالي لا يوجد ارتباط بين استخدام الزيوت أوالمرطبات الجلدية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام أي لا يوجد علاقة بين الإصابة بالنخالية المبرقشة واستخدام الزيوت أوالمرطبات الجلدية، والشكل البياني التالي يوضح ذلك:



شكل رقم (44) :النسبة المئوية لعينات المرضى حسب استخدامهم لزيوت أو مرطبات جلدية وفق نتائج تلوين غرام

5-المقارنة مع دراسات أخرى:

بما أن دراستنا هي الأولى من نوعها التي استخدمت تلوين غرام للوسوف لتشخيص النخالية المبرقشة لذلك تمت مقارنة ارتباط الملاسيزيا مع عدد من العوامل السريرية في دراستنا مع دراسات عالمية ، ومقارنة دراستنا مع دراسات استخدمت تلوين غرام للكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة لالتهاب الجريبات الشعرية.

في دراسة أجريت في تايوان [59]ونشرت نتائجها سنة 2017 وكان هدفها تقصي استخدام تلوين غرام في الكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة لالتهاب الجريبات الشعرية، وتم اجراؤها على 32 مريض وبلغ عدد الذكور 28 بنسبة 87.5% وعدد الإناث 4 بنسبة 12.5%، وتراوحت الأعمار بين (12-75) بمتوسط عمري 33.8%، وكان تلوين غرام إيجابي عند 26 مريض شخص لهم التهاب جريبات بنسبة 81.3% وبلغت حساسية تلوين غرام 84.6%، وبناء على ذلك أثبتت هذه الدراسة أن تلوين غرام اختبار بسيط وغير راض للكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة لالتهاب الجريبات الشعرية، ومنه نجد أن دراستنا توافقت مع الدراسة التايوانية حيث أثبتنا أن تلوين غرام طريقة مخبرية بسيطة وسهلة للكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة، وتقاربت قيمة حساسية تلوين غرام في دراستنا مع حساسية التلوين في الدراسة التايوانية حيث بلغت حساسية تلوين غرام في دراستنا80.39%، هذا وقد أجريت على 51 مريض(عدد الذكور 10 بنسبة 19.6% و عدد الإناث 41 بنسبة 80.4%) وتراوحت الأعمار في دراستنا بين (16-42) بمتوسط عمري29.55 .

علاقة النخالية المبرقشة المسببة بالملاسيزيا الفرفرية مع الجنس والعمر:

في دراسة أجريت في إيران عام 2012 بعنوان[60]:

Identification of Malassezia Species Isolated from Patients With Pityriasis Vercicolor in Sari Iran

تم إجراؤها على 134 شخص كان منهم 116 مريض تم تشخيص إصابتهم بالنخالية المبرقشة ونسبتهم 85.5% منهم 60 ذكور (44.8%)، و 74 إناث (55.2%) .

نسبة الإصابة بالنخالية المبرقشة	دراستنا (العمر بالسنوات)	نسبة الإصابة بالنخالية المبرقشة	الدراسة الإيرانية (العمر بالسنوات)
(%11.6)6	10-20	%(64.2)86	15-24
%(31.4)16	20-30	%(27.6)37	25-34
%(47.1)24	30-40	%(4.5)6	35-44
%(9.8)5	40-50	%(3.7)5	أكبر أو يساوي 45
%(100)51	المجموع	%(100)134	المجموع

جدول رقم (28) يبين توزع الإصابة بالنخالية المبرقشة حسب العمر وفق الدراسة الإيرانية مقارنة مع دراستنا

وتبعا لهذه الدراسة تبين أنه لا يوجد ارتباط هام بين الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة والجنس حيث كانت قيمة p=0.055>0.05 ومنه نجد أن دراستنا توافقت مع الدراسة الإيرانية حيث بلغت قيمة p=0,178 >0,05 في دراستنا .

وبحسب الدراسة الإيرانية أيضاً تبين أنه يوجد ارتباط هام بين العمر وتكرار الملاسيزيا حيث كانت قيمة P=0,014<0.05 وهذا لا يتوافق مع دراستنا التي توصلنا فيها أنه لايوجد ارتباط بين الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة والعمر، حيث كانت الفئة العمرية الأكثر إصابة بالنخالية المبرقشة في دراستنا هي الفئة العمرية بين (30-40) سنة والفئة العمرية الأكثر إصابة في الدراسة الإيرانية هي

الفئة العمرية بين (15–24) سنة، وبلغت قيمة P=0,08 >0,05 في دراستنا وقد يعود السبب إلى صغر حجم العينة.

نذكر أيضاً أن هناك بعض الدراسات التي استخدمت تلوين غرام لتلوين آفات النخالية المبرقشة دون ذكر حساسية تلوين غرام أو مقارنتها مع طرق أخرى مثل هذه الدراسة التي كانت بعنوان[43]:

In Vivo Gram Staining of Tinea Versicolor

حيث تم فيها تطبيق تلوين غرام (بنفسجية الجانسيان)على الآفات الجلدية المصابة بالنخالية عند بعض المرضى، وملاحظة اشتداد اللون في المنطقة المصابة بينما في دراستنا طبقنا تلوين غرام على الوسوف المأخوذة من الآفات الجلدية المصابة بالنخالية المبرقشة، وتوصلت تلك الدراسة إلى أن تلوين غرام اختبار وسهل وغير مكلف لتشخيص أو نفي النخالية المبرقشة ومنه نجد أن دراستنا توافقت مع تلك الدراسة.

6-الملخص والمناقشة:

النخالية المبرقشة خمج فطري شائع منتشر عالمياً، وينتشر في بلادنا بشكل كبير، وهو ناتج عن فطور خمائرية أليفة الشحم تدعى الملاسيزيا الفرفرية، وهي من الفطور المطاعمة في الجلد وتتحول إلى فطور ممرضة بوجود عوامل مؤهبة كالتعرق المفرط.

تشكل النخالية المبرقشة نسبة كبيرة من مراجعي العيادات الجلدية، وتصيب عادة الأعمار الشابة، ويعتبر التشوه التجميلي الناتج عن خلل التصبغ أكثر الأعراض إزعاجاً عند المرضى، ويعتمد تشخيصها بشكل رئيسي على المظاهر السريرية لكن لا بد من إجراء الفحوص المخبرية لتأكيد تشخيص النخالية المبرقشة ونفي الأمراض الجلدية التي تدخل في تشخيص تفريقي معها كالبهاق والنخالية الوردية، كل ذلك دفعنا لدراسة طريقة مخبرية جديدة لتشخيص النخالية المبرقشة وهي طريقة تلوين

غرام مما يفيد في تأكيد أو نفي التشخيص السريري، ومقارنة حساسية تلك الطريقة مع حساسية التحري المباشر التي تستخدم روتينياً للكشف عن فطور الملاسيزيا.

شملت دراستنا 51 مريض من مراجعي العيادات الجلدية في مشفى الأمراض الجلدية الجامعي بدمشق، وكانوا من الجنسين وبمختلف الأعمار، وتم تشخيص إصابتهم بالنخالية المبرقشة سريرياً، وقمنا بأخذ العينات من الوسوف الجلدية ولوناها بتلوين غرام وزرقة الميتيلين، وأجرينا لها أيضا تحري مباشر باستخدام KOH ، وتم إجراء دراسة مقطعية عرضية على العينات.

لدى إجراء الاختبارات الإحصائية وجدنا أنه لا يوجد علاقة بين جنس المرضى وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام، وهذا ما أشارت إليه بعض الدراسات العالمية، كذلك لم تظهر الاختبارات الإحصائية وجود ارتباط بين عمر المرضى أو مهنتهم أو ممارستهم للرياضة وبين إيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام .

درسنا العلاقة بين وجود سوابق مرضية أو مناعية وبين تلوين غرام ولم تظهر الاختبارات الإحصائية وجود ارتباط بين السوابق المرضية أو المناعية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام.

شكل المرضى الذين لديهم تعرق مفرط النسبة الأكبر من مرضى دراستنا وبالرغم من ذلك لم توجد فروق إحصائية هامة أي لا توجد علاقة بين التعرق الزائد وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام، وقد يعود السبب إلى صغر حجم العينة في دراستنا .

ومن الجدير بالذكر أن الاختبارات الإحصائية لم تظهر وجود ارتباط بين القصة العائلية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام مما يؤكد الاستعداد الشخصي للإصابة وليس العدوى، كما بينت الاختبارات الإحصائية أيضاً عدم وجود ارتباط بين تناول المرضى للأدوية الستيروئيدية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام.

لم تكن الحكة موجودة عند أغلب مرضى دراستنا وكانت نسبة المرضى الذين لم توجد لديهم حكة وكان تلوين غرام إيجابي في عيناتهم أعلى من نسبة المرضى الذين وجد لديهم حكة وتلوين غرام إيجابي في عيناتهم، وأظهرت الاختبارات الإحصائية وجود ارتباط بين الحكة ونتيجة التلوين وبلغت قيمة P=o,o18 أي أن وجود الحكة أثر سلباً على إيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام، وقد يكون السبب أن حك الآفة يمكن أن يؤدي إلى زوال الوسوف وبالتالي يعطي نتائج سلبية كاذبة .

كما أظهرت الاختبارات الإحصائية عدم وجود ارتباط بين استخدام الزيوت أو المرطبات الجلدية وإيجابية التحري عن الملاسيزيا بتلوين غرام وذلك عكس ما هو متعارف عليه علمياً بوجود ارتباط هام بين استخدام الزيوت أو المرطبات الجلدية وحدوث النخالية المبرقشة المسببة بالملاسيزيا، وقد يكون السبب صغر حجم العينة في دراستنا .

ولاحظنا عند إجراء تلوين غرام وزرقة الميتيلين على عينات دراستنا أنهما أعطيتا نفس النتائج ، وبالتالي يوجد تطابق تام بين الطريقتين، وبلغت نسبة العينات إيجابية تلوين غرام وزرقة الميتيلين 80.39% بينما بلغت نسبة العينات إيجابية التحري الفطري المباشر 74.51%، أي أن حساسية تلوين غرام في دراستنا 80.39% بينما بلغت نسبة حساسية التحري المباشر 74.51% (أي أن الحساسيتين متقاربتين والفارق بينهما بسيط) ولدراسة وجود فرق بين تلوين غرام والتحري المباشر والمقارنة بينهما تم استخدام الاختبارات الإحصائية التي أظهرت أنه لا يوجد فرق إحصائي هام بينهما حيث كانت قيمة P= 0,25 بالرغم من أن حساسية تلوين غرام أعلى من حساسية التحري المباشر بنسبة بسيطة، ويجدر بالذكر ان حساسية تلوين غرام في دراستنا كانت قريبة جداً من حساسية تلوين غرام في الدراسة التايوانية التي استخدمت التلوين للكشف عن الملاسيزيا المسببة لالتهاب الجريبات الشعرية .

إن أهم ما توصلت إليه دراستنا هو أن تلوين غرام طريقة بسيطة يمكنها الكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة، وبما أننا وجدنا أن استخدامه في التحري عن الملاسيزيا يزيد الحساسية تقريباً 6% عن حساسية التحري المباشر فهذا يعني أنه ليس من الضروري استخدامه كطريقة مخبرية بديلة عن التحري المباشر كونه يحتاج وقتاً أطول ومراحل أكثر، ويعطي نتائجاً متقاربة على الرغم من سهولة كشف وتمييز فطور الملاسيزيا مجهرياً في العينات عند تلوينها بغرام .

7- التوصيات :

- يمكن استخدام تلوين غرام في الكشف عن فطور الملاسيزيا المسببة للنخالية المبرقشة مخبرياً، حيث لا يتطلب تلك الخبرة في الفحص المجهري بسبب المظهر الفطري التلويني المجهري الواضح والذي لا يلتبس مع أشياء أخرى في المحضر.
- يمكن الاستعاضة عن تلوين غرام بطرق تلوينية تتطلب زمناً أقل في الكشف عن فطور الملاسيزيا كزرقة الميتيلين كونها تتطلب مرحلة واحدة وتستغرق وقتاً أقل.
- التأكيد على الاستمرار باستخدام KOH للتحري المباشر عن الملاسيزيا بعد إجراء تشفيف كامل لوسوف النخالية المبرقشة لمنع النتائج السلبية الكاذبة.

8-المقترحات:

- يجب الالتزام بالتوقيت الزمني المحدد من الشركة المصنعة عند إجراء تلوين غرام حتى تكون النتائج دقيقة.
- يجب أن يكون الفاحص خبير جداً عند إجراء التحري المباشر عن فطور الملاسيزيا والفحص المجهري.

9-المراجـــع:

1. Ashbee RA , Evans EGV . Immunology of Disease Asociated with Malassezia Species.Clin Microbiol Rev ; 2002. Ch 15;P:21 -57.
2. Desgarennes M del CP. Pityriasis Versicolor .Dermatologia Rev. Mex ; 2005. Ch 49; P: 157-67
3. Diongue K, Kébé O, Faye MD, Samb D, Diallo MA, Ndiaye M, Seck MC, Badiane AS, Ranque S, Ndiaye D. MALDI-TOF MS identification of Malassezia species isolated from patients with pityriasis versicolor at the seafarers' medical service in Dakar, Senegal. J Mycol Med. 2018 Dec;28(4):590-593.
4. Roderick J. Hay and Midgley G : malassezia yeasts from a Historical Perspective. " Malassezia and the skin 1st ed " .ED.Boekhout T , Ghueho E . Mayser P, and Velegraki A, Pub .Springer ; 2010. P : 1-17
5. Bond R., Guillot J. and Cabanes J. : Malassezia yeasts in Animal Disease" Malassezia and the skin 1st ed".." ED .Boekhout T.Ghueho E. Maysar P. and velegraki A . Pub.Springer ; 2010. P: 271-301.
6. Cabanes, F.J.; Vega, s: Castella, G.: Malassezia cuniculi a novel yeast species isolated from rabbit skin. Journal Medical Mycologe ; 2010. P: 40-49 .
7. Nenoff P, kruger C, M ayser P . (Cuataneous Malassezia infections and Malassezia associated dermatoses: An update). Hautarzt. 2015; 66(6): 465 -84.
8. Pedrosa AF, Lisboa C, Rodrigues AG Malassezia infections: A medical conundrum. J Am Acad Dermatol. 2014; 71: 170-176.
9. Karhoot J, Noaimi A , Ahmad W, loslation and identification of malassezia species in patients pityriasis versicolor.The Iraqui Postgraduate Medical Journal. 2012; 11: 724- 30

10. Gupta AK, Lane D, Paquet M. Systematic Review of Systemic Treatments for Tinea Versicolor and Evidence- Based Dosing Regimen Recommendations. J Cutan Med Surg. 2014;18:79-90.
11. Mendez-Tovar LJ Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. Clin Dermatol. 2010;28: 185-189.
12. Harada K, Saito M, Sugita T, et al. Malassezia Species and their associated skin diseases .J Dermatol. 2015;42: 250- 257.
13. Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V. Malassezia species in skin diseases. Curr Opin Infect Dis. 2002;15:133-42.
14. Prohic A, Ozagovic L. Malassezia species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor. Mycoses; 2007. Ch 50; P:58-63.
15. Mohamoudbadi A., MossaviZ. , and Zarrin M. : Pityriasis Versicolor in Ahvaz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology; 2009.Ch 2; P: 92-96.
16. Kundu RV, Garg A. Yeast Infections: Candidiasis, Tinea (Pityriasis) Versicolor, and Malassezia (Pityrosporum) Folliculitis. In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 8th ed. The McGraw-Hill Companies; 2012. P: 2298-311.
17. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Faergemann J Pityriasis versicolor.Dermatol Clin. 2003; 21: 413-429.
18. Alvarado Z, Pereira C. Fungal diseases in children and adolescents in a referral centre in Bogota, Colombia. Mycoses. 2018 Aug; 61(8): 543–548.
19. De Luca DA, Maianski Z, Averbukh M. A study of skin disease spectrum occurring in Angola phototype V-VI population in Luanda. Int. J. Dermatol.2018 Jul;57(7):849-855.

20. Gupta AK, Bluhm R,Summerbell RC.Pityriasis versicolor. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2002; 16: 19-33.

21. Hyun Ko J., Won Lee Y.,Beom Choe Y.,Joong Ahnk. Epidemiologic Study of Malassezia Yeasts in patient with Malassezia Folliculitis by 26s rDNA PCR. RFLP Analysis. Ann Dermatol; 2011.P: 177-184.

22. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J Our Current Understanding of Fungal Biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009; 35: 340-355.

23. Vlassova N, Han A, Zenilman JM, James G, Lazarus GS New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. Br J Dermatol. 2011; 165: 751-759.

24. Figueredo LA, Cafarchia C, Desantis S, Otranto D. Biofilm formation of Malassezia pachydermatis from dogs. Vet Microbiol . 2012; 160: 126-131.

25. Kaplan JB. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. J Dent Res. 2010; 89: 205-218.

26. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013; 3: a010306-a010306.

27. Ashbee H., and Bond R., Malassezia Species and Immunity, "Male the skin 1st ed". ED. Bockhout T., Ghueho E., Mayser P., and Val Springer;2010.P: 139-175,.

28. Kallini JR , Riaz F , Khachemoune A . Tinea versicolor in dark _skinned individuals. Int J Dermatol. 2014;53(2): 137-41 .

29. Brandi N, Starace M, Alessandrini A,Piraccini BM. Tinea versicolor of the neck as side effect of topical

steroids for alopecia areata. J Dermatolog Treat. 2019 Dec;30(8):757-759.

30. Choi FD, Juhasz MLW, Atanaskova Mesinkovska N. Topical ketoconazole: a systematic review of current dermatological applications and future developments. J Dermatolog Treat. 2019 Dec;30(8):760-771.

31. Varada S, Dabade T, Loo DS. Uncommon presentations of tinea versicolor. Dermatol Pract Concept. 2014;4(3):93-6.

32. Crous LN . Tinea Versicolor .eMedicine(Medscape). 2018 May22.Available at: https://emedicine.medscape.com/article/1091575-overview

33. Elewski BE, Hughey LC , Hunt KM , et al. Fungal Diseases. In : Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L, Callen JP, Cowen EW, Hruza GJ, et al ., editors. Dermatologly. 4th ed. USA: Elsevier; 2018. P:1329 – 62.

34. Haiduk J, Treudler R, Ziemer M. Atrophying tinea versicolor with epidermal atrophy. J Dtsch Dermatol Ges. 2016;14(7):740-3.

35. Gupta D, Thappa DM . The enigma of color in tinea versicolor. Pigment Int.n 2014; 1(1):32-5.

36. Errichetti E, Stinco G. Dermoscopy in General Dermatology: A Practical Overview. Dermatol Ther (Heidelb). 2016 Dec;6(4):471-507.

37. Prohic A, jovovic Sadikovic T, Krupalija-Fazlic M, Kuskunovic-Vlahovljak S. Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. Int. J. Dermatol. 2016 May;55(5):494-504.

38. Rosen T. Mycological Considerations in the Topical Treatment of Superficial Fungal Infections. J Drugs Dermatol.2016 Feb;15(2 Suppl):s49-55.

39. Song HS, Kim SK, Kim YC . Comparison between Malassezia Folliculitis and Non -Malassezia Folliculitis . Ann Dermatol. 2014;26: 598-602.

40. Hay RJ, Ashbee HR. Fungal infections In: Griffiths C, Barker J, Bleiker T, Chalmers R, Creamer D, editor. Rook's Textbook of Dermatology. 9th ed . John Wiley & Sons; 2016. P: 32.1-32.96.

41. Rubenstein RM, Malerich SA. Malassezia (pityrosporum) folliculitis. J Clin Aesthet Dermatol. 2014;737-41.

42. Hald M, Arendrup MC Svejgaard EL, et al Evidence-base Danish guidelines for the treatment of Malassezia-relate diseases. Acta Derm Venereol 2015; 95 (1): 12 19.

43. Spence-Shishido A, Carr C, Bonner MY, Arbiser JL. In Vivo Gram Staining of Tinea Versicolor. JAMA Dermatol. 2003; 149: 991-992.

44. Colco R. "Gram Staining". Current Protocols in Microbiology. 2005; 00 (1): Appendix 3C.

45. Galperin, Michael Y. "Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes".2013;12-27.

46. a b c Tim, Sandle. Pharmaceutical microbiology: essentials for quality assurance and quality control. 2015;10-21.

47. a b c d Madigan, M.T.; Martinko J.; Parker J. Brock Biology of Microorganisms (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.(2004).

48. Berrios RL, Arbiser JL. Effectiveness of gentian violet and similar products commonly used to treat pyodermas. Dermatol Clin. 2011;29(1):69-73.

49. Zhang X, Zheng Y, Fried LE, et al. Disruption of the mitochondrial thioredoxin system as a cell death mechanism of cationic triphenylmethanes.Free Radic Biol Med. 2011;50(7):811-820.

50. Carreira A, Ferreira JB, Pereira I, et al. Blad-containing oligomer: a novel fungicide used in crop protection as an alternative treatment for tinea pedis and tinea versicolor. J Med Microbiol. 2018;67(2):198-207.

51. Gupta AK, Foley KA. Antifungal Treatment for Pityriasis Versicolor. J Fungi (Basel). 2015 Mar 12;1(1): 13-29.

52. Gupta AK, Lyons DC. Pityriasis versicolor: an update on pharmacological treatment options. Expert Opin Pharmacother. 2014 Aug;15(12):1707-13.

53. Hawkins DM, Smidt AC. Superficial fungal infections in children. Pediatr. Clin. North Am. 2014 Apr; 61 (2): 443-55.

54. Karray M, Mckinney WP. Tinea Versicolor, StatPearis [Internet]. 2018 Dec 26. Available at https// ww.ncbi. nlm.nih.gov/books/NBK482500/.

55. Gold M, Bridges T, Avakian E, Plaum S, Pappert EJ, Fleischer AB, et al. An open-label study of naftifine hydrochloride 1% gel in the treatment of tinea versicolor. Skin Med; Sept 2011. Ch 9; P: 283-6.

56. Hald M, Arendrup M.C, Svejgaard E.L, et al. Evidence-based Danish Guidelines for the Treatment of Malassezia-related Skin Diseases. Acta Derm Venereol. 2015;95(1):12-9.

57. U.S. Food and Drug Administraion. Nizoral (ketoconazole) oral tablets: Drug Safety Communication – Prescribing for unapproved uses including skin and nail infections continues; linked to patient death. FDA Medwatch.
2016 May 19. Available at:

https://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyalertsforhuma nmedicalproducts/ucm502073.htm.

58. Hudson A, Sturgeon A, Peiris A. Tinea Versicolor. JAMA. 2018; 320 (13): 1396.

59. Yi-Hsien S, Szu-Ying C, Che-Yuan H. Utility of Gram Staining for diagnosis of Malassezia folliculitis. The Journal of Dermatology. 2017; 45(2) : 228-231.

60. Parvaneh A, Maryam G, Shamsi K. Identification of Malassezia Species Isolated from Patients With Pityriasis Versicolor in Sari, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 2012; 6(6): e8581.