

## Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens and evaluation of their antifungal susceptibility testing to ketoconazole and nystatin with a review of studies

Niusha Kaveh <sup>1</sup> , Ayatollah Nasrolahi Omran <sup>1\*</sup> , Mohammad Taghi Hedatyati <sup>2,4\*</sup> , Mojtaba Taghizadeh-Armaki <sup>3</sup> , Mahdi Abastabara <sup>2,4</sup> , Saeed Mahdavi Omran <sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Dept of mycology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

<sup>2</sup> Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Dept of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

<sup>4</sup> Dept of Medical mycology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

### Article Info

**Article type:**  
Research article

**Article History:**

Received: Dec. 04, 2023

Revised: Jan. 21, 2024

Accepted: Jan. 27, 2024

Published Online: Jun. 22, 2024

**\* Correspondence to:**

Ayatollah Nasrolahi Omran

Dept of mycology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Mohammad Taghi Hedatyati

Invasive Fungi Research Center, Communicable Diseases Institute, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Email:

ayat51@yahoo.co.in

hedayatimt@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** Candidiasis is a fungal infection caused by *Candida* yeasts in immunocompromised patients. This study aimed to assess antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to ketoconazole and nystatin by broth microdilution.

**Material & Methods:** In this descriptive-analytical study, 377 clinical isolates of *Candida* species were collected from different regions of Iran. The species were identified using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. The antifungal susceptibility testing of clinical isolates of *Candida* species to ketoconazole and nystatin was performed using broth microdilution according to standard protocol CLSI (M27-A3 and M27-S4). The standard strain of *Candida parapsilosis* was used as the quality of control. The minimum inhibitory of concentrations was determined after 24h at 37 °C.

**Results:** Based on molecular identification, *Candida albicans* 266 (70.7%), *C. krusei* 64 (17%), *C. parapsilosis* 40 (10.7%), and *C. tropicalis* 6 (1.6%) were identified. The MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> values of ketoconazole and nystatin for all isolates were 0.063 µg/ml, 0.031 µg/ml, 2 µg/ml, and 4 µg/ml, respectively.

**Discussion & Conclusion:** As evidenced by the results of this study, antifungal susceptibility testing along with the identification of fungi at the species level would certainly be very useful in selecting primary antifungal agents for treatment, especially in invasive fungal infections. According to our findings, ketoconazole was much more effective on *Candida* spp. than nystatin.

**Keywords:** Antifungal susceptibility testing, *Candida*, Molecular identification

### How to cite this paper

Kaveh N, Nasrolahi Omran A, Hedatyati MT, Taghizadeh-Armaki M, Abastabara M, Mahdavi Omran S. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens and evaluation of their antifungal susceptibility testing to ketoconazole and nystatin with a review of studies. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(2): 105-115.

# اپیدمیولوژی مولکولی گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی و ارزیابی حساسیت دارویی آنها نسبت به کتوکونازول و نیستاتین با مروری بر مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و ارزیابی حساسیت دارویی گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی

نیوشا کاوه<sup>۱</sup>، آیت اله نصرالهی عمران<sup>۱\*</sup>، محمد تقی هدایتی<sup>۲</sup>، مجتبی تقی زاده ارمکی<sup>۳</sup>، مهدی عباس تبار<sup>۴</sup>، سعید مهدوی عمران<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه فارچ شناسی، دانشکده علوم پزشکی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات فارچ های تهاجمی، پژوهشکده بیماریهای واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

<sup>۳</sup> گروه انگل شناسی و فارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

<sup>۴</sup> گروه فارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

## نوع مقاله: پژوهشی

**مقدمه:** کاندیدایزیس عفونتی قارچی است که توسط مخمرهایی از جنس کاندیدا در شرایط ضعف دستگاه ایمنی ایجاد می‌شود. این مطالعه به منظور ارزیابی حساسیت دارویی ایزوله‌های کلینیکی کاندیدا نسبت به داروهای کتوکونازول و نیستاتین به روش برات میکروداپلوشن انجام شد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲

## نویسنده مسئول:

آیت اله نصرالهی عمران

گروه فارچ شناسی، دانشکده

علوم پزشکی، واحد تنکابن،

دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن،

ایران

محمد تقی هدایتی

مرکز تحقیقات فارچ های

تهاجمی، پژوهشکده بیماریهای

واگیر، دانشگاه علوم پزشکی

مازندران، ساری، ایران

## Email:

ayat51@yahoo.co.in

hedayatimt@gmail.com

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، تعداد ۳۷۷ ایزوله بالینی کاندیدای جدا شده از شهرهای مختلف ایران با استفاده از روش PCR-RFLP شناسایی مولکولی گردید. آزمایش حساسیت دارویی ایزوله بالینی کاندیدا به روش برات میکروداپلوشن بر اساس دستورالعمل استاندارد CLSI (M27-A3 و M27-S4) برای داروهای کتوکونازول و نیستاتین صورت گرفت. برای ارزیابی صحت کار از سویه‌های استاندارد *Candida parapsilosis* استفاده شد. حداقل غلظت بازدارندگی رشد (Minimum Inhibitory of Concentration: MIC) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C تعیین گردید.

**یافته‌های پژوهش:** بر اساس شناسایی مولکولی، گونه‌های کاندیدا آلیکنس ۲۶۶ (۷۰/۷ درصد)، کاندیدا کروژنی ۶۴ (۱۷ درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس ۴۰ (۱۰/۷ درصد) و کاندیدا تروپیکالیس ۶ (۱/۶ درصد) شناسایی شدند. میزان MIC<sub>50</sub> و MIC<sub>90</sub> کتوکونازول و نیستاتین برای همه این ایزوله‌ها به ترتیب ۲ μg/mL، ۴ μg/mL، ۰/۰۳۱ μg/mL و ۰/۰۶۲ μg/mL بود.

**بحث و نتیجه‌گیری:** استفاده از آزمایش ارزیابی حساسیت دارویی همراه با شناسایی قارچ تا سطح گونه قطعاً در انتخاب عوامل ضدقارچی اولیه برای درمان، به ویژه در عفونت‌های قارچی تهاجمی، بسیار مفید خواهد بود. بر اساس نتایج مطالعه ما، داروی کتوکونازول روی ایزوله‌های کاندیدا بسیار مؤثرتر از نیستاتین بوده است.

**واژه‌های کلیدی:** شناسایی مولکولی، کاندیدا، حساسیت دارویی

**استناد:** کاوه نیوشا، نصرالهی عمران آیت اله، هدایتی محمد تقی، تقی زاده ارمکی مجتبی، عباس تبار مهدی، مهدوی عمران سعید. اپیدمیولوژی مولکولی

گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی و ارزیابی حساسیت دارویی آنها نسبت به کتوکونازول و نیستاتین با مروری بر مطالعات اپیدمیولوژی

مولکولی و ارزیابی حساسیت دارویی گونه‌های کاندیدا جدا شده از نمونه‌های بالینی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۳؛ ۳۲(۲): ۱۱۵-۱۰۵.

الگوی حساسیت دارویی ضدقارچی عامل مهم و تعیین کننده‌ای در نتیجه درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های قارچی است. در چند دهه اخیر، شیوع عفونت‌های ناشی از *کاندیدا* در حال افزایش است. از سوی دیگر، انتخاب عوامل ضدقارچی مناسب به علت مقاومت برخی از گونه‌ها به چندین عامل ضدقارچ، بسیار محدود شده است (۱، ۲). گونه‌های *کاندیدا* می‌توانند باعث عفونت‌های سطحی تا *کاندیدمی* تهدیدکننده زندگی شوند. این قارچ همچنین از عوامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی در افراد با نقص سیستم ایمنی است. *کاندیدا آلیکنس* عامل اصلی عفونت *کاندیدیا* است؛ اما انتشار گونه‌های غیر *آلیکنس* *کاندیدا* در حال افزایش است (۳، ۴). این گونه‌ها باعث ایجاد عفونت در بیماران به ویژه مبتلایان به بیماری‌های زمینه‌ای می‌شوند. روش‌های مختلف در شناسایی *کاندیدها* شامل روش‌های بیوشیمیایی، کشت و روش‌های مولکولی است. در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی به علت داشتن سرعت و دقت بیشتر در تشخیص *کاندیدها* متداول تر شده و استفاده از این روش‌ها را اجتناب‌ناپذیر کرده است. فعالیت‌های عوامل ضدقارچی گزینه‌های درمانی مهمی برای کنترل عفونت‌های ناشی از این مخمرها هستند. درمان مناسب به وضعیت ایمنی و بیماری‌های زمینه‌ای بیماران، گونه‌های خاص *کاندیدای* درگیر و الگوی حساسیت آن به عوامل ضدقارچی بستگی دارد (۵). مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) نقاط شکست (breakpoints) بالینی ویژه گونه‌های *کاندیدا* را برای برخی از عوامل ضدقارچی مانند آزولها، پلینها و اکینوکاندینها توصیف کرده است. استفاده از چنین معیار تعریف شده از الگوهای تأثیر حساسیت گونه‌های *کاندیدا* نسب به داروهای ضدقارچ مختلف، به مدیریت درمانی بهتر بیماران منجر می‌گردد. داروی کتوکونازول هم نخستین آزول خوراکی بود که کمتر کاربرد سیستمیک دارد. از جمله عوارض این دارو مشکلات گوارشی، تهوع، خارش، راش پوستی و ژنیکوماستی است. گزارش‌های اخیر از کشورها و بیمارستان‌های مختلف نشان داده‌اند که میان غیر *آلیکنس* ها و

میزان مقاومت به آزول ارتباط وجود دارد (۶، ۷). نیستاتین یک داروی ضدقارچی است که اولین بار از *استریتومایسس* نورسئی به دست آمده است و به وفور به صورت پماد جلدی و یا خوراکی مصرف می‌گردد. این دارو فونزید است و به علت پیوستن به استرول‌های غشا (استرول)، بر روی نفوذپذیری غشای قارچ اثر می‌گذارد. این آنتی‌بیوتیک پلی‌ان به سبب فعالیت ضدقارچی بالا در برابر پاتوژن‌های قارچی نظیر *کاندیدا*، به صورت گسترده در *کاندیدیا*زیس استفاده می‌شود. البته افزایش استفاده از آن در سال‌های اخیر به افزایش چشمگیر مقاومت به این منجر دارو شده است؛ بنابراین، شناسایی زود هنگام و دقیق گونه‌های *کاندیدا* و توجه به الگوهای حساسیت ضدقارچی آن‌ها برای ایجاد راهبردهای مناسب برای کنترل، پیشگیری و درمان *کاندیدیا*زیس بسیار مهم است. نیستاتین رایج‌ترین عامل درمان عفونت‌های قارچی دهانی و واژینیت قارچی ایجاد شده به وسیله *کاندیدا* *آلیکنس* است. بسته به غلظت‌های تجویز شده، این دارو می‌تواند هم خواص کشندگی و هم مهارکنندگی قارچ را داشته باشد. به دلیل نبود اطلاعات زمینه‌ای درباره مطالعات آزمایشگاهی در ارتباط با آزول‌های بسیار جدید و نبود اطلاعات کمتری در مقایسه با مقاومت به آزول‌ها در ارتباط با گونه‌های *کاندیدایی* مقاوم به آزول‌ها، کار با نیستاتین بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق به عنوان یک عامل سنجش انجام گرفت تا تهیه گزارش مناسبی از این بخش صورت گیرد؛ همچنین از سویی، نمونه‌های *کاندیدا* *آلیکنس* نسبت به داروهای کتوکونازول و نیستاتین از حساسیت خوبی برخوردارند، در حالی که دیگر داروها ظاهراً حساسیت مناسبی ندارند (۸، ۹). با عنایت به گزارش‌های بررسی‌های مختلف انجام گرفته و ارائه شده در اطلاعات جدول شماره ۱، درباره نتایج جداسازی نمونه‌های *کاندیدایی* از شهرهای مختلف و حساسیت دارویی آن‌ها، می‌توان اطلاعات اپیدمیولوژی مناسبی برای پیشگیری در اختیار سیاستمداران بهداشتی مناطق مختلف قرار داد تا اقدامات پیشگیری مناسب‌تری انجام گیرد؛ از این رو، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی گونه‌های *کاندیدای* جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف

جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و ارزیابی حساسیت دارویی آن‌ها نسبت به دو داروی کتوکونازول و نیستاتین انجام شد.

**جدول شماره ۱.** منابع ۴۸۱ گونه از کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی در ایران

نوع نمونه	خصوصیت منابع عفونت	تعداد نمونه بر حسب درصد
نمونه‌های بال	کلنیزاسیون	۴۰۰ (۸۳/۲)
خلط	کلنیزاسیون	۳۰ (۶/۲)
پوسته‌های ناخن	انیکومایکوزیس	۳۰ (۶/۲)
خون	کاندیدیمی	۲ (۰/۴)
پوست	کاندیدیوزیس کشاله‌ران	۲ (۰/۴)
دهان	برفک دهانی	۲ (۰/۴)
مایع مغزی نخاعی	عفونت دستگاه اعصاب مغزی	۱ (۰/۲)
ادرار	کلنیزاسیون	۱۰ (۲/۱)
واژن	کاندیدیوزیس واژینال	۴ (۰/۸)
کل		۴۸۱ (۱۰۰)

## مواد و روش‌ها

در تأمین بیشتر هزینه‌های این تحقیق، همه نمونه‌های جمع‌آوری شده شناسایی مولکولی شدند که نظر به چندین کار عملی، به‌ویژه در انجام آزمایش دارویی، گزارش بخشی از انجام پژوهش در این مقاله ارائه گردیده است. اطلاعات دموگرافیک بیماران در جدول شماره ۲ ذکر شده است.

جمع‌آوری ایزوله‌ها: در مطالعه حاضر، جامعه آماری تعداد ۳۷۷ ایزوله کاندیدای جدا شده از نمونه‌های بالینی گوناگون از نقاط مختلف ایران است که در دانشگاه علوم پزشکی مازندران جمع‌آوری و کارهای عملی آن انجام گردید. با توجه به همکاری دانشگاه علوم پزشکی مازندران

**جدول شماره ۲.** خلاصه‌ای از نتایج آزمایش‌های حساسیت ایزوله‌های بالینی کاندیدا نسبت به دو داروی نیستاتین و کتوکونازول در مطالعات مختلف از ایران در سالهای اخیر

P-value	GM	MIC <sub>90</sub> (µg/ml)	MIC <sub>50</sub> (µg/ml)	MIC rang (µg/ml)	داروهای قارچی	تعداد گونه‌های کاندیدا
< ۰/۰۵	۰/۰۳۶	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱ - ۱۶	کتوکونازول	کاندیدا آلبیکنس (۲۶۶)
	۲/۰۳	۴	۲	۰/۵ - ۸	نیستاتین	
	۰/۰۴۶	۰/۱۲۵	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱ - ۲	کتوکونازول	کاندیدا کروزوی (۶۴)
	۲/۰۶	۴	۲	۱ - ۱۶	نیستاتین	
	۰/۰۳۳	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱ - ۰/۰۶۳	کتوکونازول	کاندیدا پارسیپلوزیس (۴۰)
	۱/۵۶	۲	۲	۰/۵ - ۴	نیستاتین	
	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱ - ۰/۰۳۱	کتوکونازول	کاندیدا تروپیکالیس (۶)
	۱/۷۸	۲	۲	۱ - ۲	نیستاتین	
	۰/۰۳۷	۰/۰۶۳	۰/۰۳۱	۰/۱۶ - ۰/۳۱	کتوکونازول	کل ایزوله‌های کاندیدا (۳۷۷)
	۱/۹۸	۴	۲	۰/۱۶ - ۵	نیستاتین	

ارزیابی حساسیت دارویی نسبت به کتوکونازول و نیستاتین: آزمایش حساسیت دارویی با توجه به دستورالعمل استاندارد (M27-A3 و CLSI M27-S4) برای قارچ‌های مخمری انجام شد (۱۳، ۱۲). ابتدا حجم اولیه دارویی نیستاتین و کتوکونازول (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) برای هر یک از داروهای ضدقارچی تهیه گردید. به علت غیرمحلول بودن این دو دارو در آب، پودر خالص این داروها در ۱ میلی‌لیتر از محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO, Sigma, Germany) حل شد و غلظت نهایی ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. در مرحله بعد، هر دارو با محیط RPMI1640 حاوی گلوتامین و بدون بی‌کربنات (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)، بافر شده با مورفولینوپروپان سولفونیک اسید (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) که در pH=7 تنظیم شده بود، به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق گردید و رقت‌های ۱۶-۰/۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ( $\mu\text{g/mL}$ ) به دست آمد. محدوده رقت‌های دارویی استفاده شده برای نیستاتین ۶۴-۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که برای تهیه آن، حدود ۶۴ میلیگرم از دارو را در ۵ میلی‌لیتری متیل سولفوکساید حل کردیم تا غلظتی معادل ۱۲۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آید. رقت‌های دارویی استفاده شده برای کتوکونازول در محدوده ۶۳/۴۵-۰/۳۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که برای تهیه آن، ۱/۱۴ میلی‌گرم از پودر این دارو در ۱ میلی‌لیتری متیل سولفوکساید حل گردید تا غلظت استوک معادل ۱/۱۴ گرم در میلی‌لیتر به دست آید. بر اساس دستورالعمل استاندارد، با استفاده از لوپ استریل با اندازه مشخص، مقداری از کلونی تازه (۲۴ ساعته) مخمری رشد یافته بر روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (مرک، آلمان) برداشته شد و در یک لوله استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل گردید؛ سپس جذب نوری سوسپانسیون قارچی به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتری و در طول موج ۵۳۰ خوانده و غلظت نهایی سوسپانسیون قارچی در کووت با ترانزمیشن ۷۷-۷۵ درصد خوانده شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی تهیه شده با محیط RPMI به همه

شناسایی فوتویی: برای کشت اولیه از محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کارامفنیکل (مرک، آلمان) استفاده شد. شناسایی اولیه گونه‌های کاندیدا بر روی محیط کروم آگار (کروم آگار، فرانسه) صورت گرفت. پس از رشد کلونی‌های مخمری، با استفاده از لوپ استریل، مقدار مشخصی از کلونی مخمری برداشت شد و به لوله‌های ایندورف حاوی آب مقطر استریل منتقل و تا موقع لازم در فریز ۸۰- نگهداری گردید (۸، ۹).

شناسایی مولکولی با روش polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP): برای استخراج DNA ایزوله‌های مخمری از روش فنل-کلروفورم و پرل شیشه‌ای استفاده شد. در این مطالعه، برای شناسایی مولکولی گونه‌های کاندیدا از پرایمرهای ۵'-(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)-3' ITS1 و ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3') به کاررفته در مطالعات پیشین استفاده گردید. PCR در یک حجم نهایی 50  $\mu\text{l}$  صورت گرفت که شامل 2  $\mu\text{l}$  از DNA الگو، 5  $\mu\text{l}$  از  $10\times$  PCR buffer، 5  $\mu\text{l}$  از گلیسرول ۵۰ درصد، 1  $\mu\text{l}$  داکسی نوکلئوزید تری فسفات (5 mM، محصول شرکت BIRON)، 5/0  $\mu\text{l}$  از هر پرایمر (با غلظت 25  $\mu\text{M}$ )، شرکت سیناکلون، ایران) و 4/0  $\mu\text{l}$  از polymerase DNA Taq (250 U، محصول Roche) بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل (BioRAD) انجام گردید. سیکل‌های گرمایی بدین شرح بود: دناتوره ابتدایی 94۰ C به مدت ۵ دقیقه که با ۳۶ سیکل به صورت زیر دنبال می‌شد: دناتوره: 94۰ C به مدت ۱ دقیقه، اتصال 52۰ C به مدت ۱ دقیقه و تکثیر 72۰ C به مدت ۱ دقیقه؛ و یک مرحله تکثیر انتهایی 72۰ C به مدت ۵ دقیقه (۲۲). به طور خلاصه، 5  $\mu\text{l}$  محصول PCR با 5/0  $\mu\text{l}$  آنزیم MSP I، 5/1  $\mu\text{l}$  بافر آنزیم و 8  $\mu\text{l}$  آب مقطر در میکروتیوب‌های 200  $\mu\text{l}$  مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 37۰ C قرار داده شد. محصول PCR روی ژل ۱ درصد و محصول RFLP روی ژل ۲ درصد الکتروفورز گردید. ژل‌ها پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، با ژل داک مشاهده شد. باندهای ایجاد شده توسط ایزوله با استاندارد مقایسه و تعیین گونه گردیدند (۱۱، ۱۰).

چاهک‌ها به غیر از کنترل منفی اضافه گردید. میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای در دمای  $C35^{\circ}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و کمترین غلظت مهاری (MIC) به صورت چشمی و با آینه مخصوص تعیین شد (۹، ۱۳، ۱۴). در مطالعه حاضر از نمونه‌های استاندارد *paecilomyces variotii* (ATCC22319) و *candida parapsilosis* (ATCC22019) برای کنترل کیفی آزمایش حساسیت استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.23 تجزیه و تحلیل شد. محدوده MIC، MIC<sub>50</sub>، MIC<sub>90</sub> و ژئومتریک مین (GM) برای داروهای کتوکونازول و نیستاتین مشخص گردید. ارتباط میان میزان حساسیت به ضدقارچ و توزیع گونه‌های کاندیدا با استفاده از آزمون دقیق فیشر و من‌ویتنی تعیین و سطح معنی‌داری در آزمون‌های آماری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. IR.IAU.TON.REC.1401.009 کد اخلاق مقاله می باشد.

### یافته‌های پژوهش

از ۳۷۷ ایزوله مخمیری که به روش مولکولی-PCR RFLP شناسایی گردیدند، ۲۶۶ مورد کاندیدا آلیکنس (۷۰/۷ درصد)، ۴۰ مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس (۱۰/۷ درصد)، ۶ مورد کاندیدا تروپیکالیس (۱/۶ درصد) و ۶۴ مورد کاندیدا کروزنی (۱۷ درصد) بودند. با توجه به نتایج ارزیابی حساسیت دارویی ایزوله‌های کاندیدا، میزان MIC<sub>90</sub> و MIC<sub>50</sub> کتوکونازول برای همه ایزوله‌ها  $0.31 \mu\text{g/mL}$  و

$0.62 \mu\text{g/mL}$  بود. ۸ مورد (۲/۱۲ درصد) از زوله‌ها MIC بالاتری نسبت به کاتاف اپیدمیولوژیکی تعیین شده برای کاندیداها داشتند که نشاندهنده مقاومت این ایزوله‌ها به کتوکونازول است ( $\text{MIC} > 1 \mu\text{g/mL}$ ). سایر ایزوله‌ها حساسیت قابلقبولی را در برابر این دارو نشان دادند ( $\text{MIC} < 1 \mu\text{g/mL}$ ). میزان MIC<sub>90</sub> و MIC<sub>50</sub> نیستاتین برای همه این ایزوله‌ها  $2 \mu\text{g/mL}$  و  $4 \mu\text{g/mL}$  بود؛ همچنین همه ایزوله‌ها حساسیت خوبی نسبت به داروی نیستاتین از خود نشان دادند ( $\text{MIC} < 8 \mu\text{g/mL}$ )، به جز یک ایزوله که  $\text{MIC} = 16 \mu\text{g/mL}$  داشت و در برابر نیستاتین از خود مقاومت نشان داد. بر اساس جدول شماره ۳، دامنه MIC داروی کتوکونازول نسبت به ایزوله‌های کاندیدا آلیکنس آ، کاندیدا کروزنی، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس به ترتیب  $0.31 - 2 \mu\text{g/ml}$ ،  $0.31 - 16 \text{ ml}$  و  $0.31 - 0.62 \mu\text{g/ml}$  بود، درحالی که این میزان برای داروی نیستاتین به ترتیب  $0.5 - 8 \mu\text{g/ml}$ ،  $1 - 16 \mu\text{g/ml}$ ،  $1 - 4 \mu\text{g/ml}$  و  $0.5 - 2 \mu\text{g/ml}$  بود. بر اساس یافته‌های ژئومتریک مین (GM)، نتایج نشان داد که داروی کتوکونازول تأثیر به مراتب بهتری نسبت به داروی نیستاتین علیه گونه‌های کاندیدا داشته است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری میان گونه‌های کاندیدا با داروهای ضدقارچ وجود نداشته است ( $P < 0.05$ ).

جدول شماره ۳. الگوی پروفایل حساسیت دارویی ایزوله‌های کاندیدیایی مطالعه شده نسبت به دو داروی ضدقارچی کتوکونازول و نیستاتین.

ارجاع	میزان (g/ml) $\mu$ MIC-rang	نام دارو	تعداد ایزوله‌ها	محل نمونه برداری	نام محقق (سال)
۲۳	۱۶-۲	نیستاتین	۱۷۳	ناخن	رزاقی و همکاران (۲۰۱۴)
	۰/۸-۰/۳۱	کتوکونازول			
۲۷	۴-۱	نیستاتین	۵۸	واژن	سمیعی و همکاران (۲۰۱۴)
۲۴	۰/۱-۰/۶	نیستاتین	۱۰۰	اوروفارنژیال	کتیرایی و همکاران (۲۰۱۵)
	۰/۸-۰/۶	کتوکونازول			
۲۸	۰/۱۶-۲۵	کتوکونازول	۴۰	سوخستگی، تنفسی، دیابت و ...	امیررجب و همکاران (۲۰۱۶)
۲۲	۰/۱۶-۰/۱	کتوکونازول	۳۹۷	خون، ادرار، BAL و خلط	بدیعی و همکاران (۲۰۱۶)
۳۱	۰/۰۶۴- > ۱۶	نیستاتین	۱۲	دهان (سرطان)	دهقان و همکاران (۲۰۱۷)



هدایتی و همکاران (۲۰۱۸)	مخاط دهان، زیر بغل و واژن	۱۱۱	کتوکونازول	۰/۸-۰۳۲	۲۸
مهدوی و همکاران (۲۰۱۸)	دهان	۱۳۴	کتوکونازول	۰/۴-۰۱۶	۳
هاشمی و همکاران (۲۰۱۹)	واژن	۹۵	نیستاتین	۰/۱۶-۲۵	۳۲
			کتوکونازول	۰/۱۶-۰۱۶	
موسوی و همکاران (۲۰۱۹)	ناخن، پوست، واژن و ...	۲۱	نیستاتین	۰/۱۶-۰۳	۱۹
آقایی و همکاران (۲۰۲۰)	ناخن، پوست، واژن و ...	۱۵	نیستاتین	۰/۲-۰۳۱	۵
	ناخن، پوست، واژن و ...	۲۳	کتوکونازول	۰/۲-۰۰۸	
شکوهی و همکاران (۲۰۲۰)	واژن	۱۴۹	نیستاتین	۰/۴-۰۰۶	۱۷
			کتوکونازول	۰/۲-۰۳۱	
کرمانی و همکاران (۲۰۲۱)	دهان	۵۵	نیستاتین	۰/۸-۵	۳
			کتوکونازول	۰/۱۶-۰۱۶	
			کتوکونازول	۰/۲-۰۳۱	
جعفریان و همکاران (۲۰۲۱)	دهان و مری	۲۳	نیستاتین	۸-۲	۲۵
مطالعه حاضر	بالینی مختلف	۳۷۷	نیستاتین	۰/۱۶-۵	---
			کتوکونازول	۰/۱۶-۰۳۱	

### بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، سویه‌های مخمر جدا شده از کشت نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به کاندیدیازیس در سطح گونه باروش‌های مرسوم و مولکولی PCR-RFLP شناسایی شدند. PCR-RFLP روش قابل‌اعتمادی برای تعیین گونه‌های کاندیدا نظیر *کاندیدا آلیکس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پارپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* است (۱۵). در این مطالعه، از مجموع ۳۷۷ ایزوله، ۷۰/۷ درصد ایزوله‌ها مربوط به *کاندیدا آلیکس* و ۲۹/۳ درصد ایزوله‌ها غیر *آلیکس* بودند که نشان‌دهنده شیوع بالای *کاندیدا آلیکس* در نمونه‌های بالینی مختلف از ایران بود. مطالعات مختلفی از ایران میزان شیوع *کاندیدا آلیکس* را به ترتیب با نرخ‌های ۱۷/۵ درصد، ۴۸ درصد، ۵۵ درصد، ۵۶/۸ درصد و ۸۲/۲ درصد از شیراز (۱۶)، مازندران (۱۷)، تهران (۱۸) و کرمان (۱۹) گزارش کردند. این میزان در مطالعه حاضر ۷۰/۵۵ درصد بود. به علت افزایش بیماری‌های ناشی از *کاندیدا* در افراد مستعد مانند مبتلایان به ایدز، افراد دیابتی، افرادی که از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و شیمی‌درمانی استفاده می‌کنند و همچنین افزایش مقاومت دارویی در انواع *کاندیدا* به‌ویژه گونه‌های غیر

*آلیکس*، توجه محققان به ارزیابی حساسیت ضدقارچی جلب شده است. کتوکونازول معمولاً برای عفونت‌های قارچی پوست و غشاهای مخاطی (به شکل‌های دارویی متنوع) تجویز می‌شود و مصرف خوراکی آن به سبب خطر آسیب کبدی محدود است. داروی نیستاتین متعلق به کلاس پلی‌ین از عوامل ضدقارچی و داروی مؤثری برای برخی از عفونت‌های قارچی نظیر *کاندیدیازیس* است (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان MIC<sub>50</sub>، MIC<sub>90</sub>، GM و دامنه MIC کتوکونازول برای همه این ایزوله‌های *کاندیدا* به ترتیب ۰/۳۱ mL، ۰/۰۶۲ μg/mL، ۰/۷ mL و ۰/۳۱ μg/mL بود، درحالی‌که این میزان برای نیستاتین به ترتیب ۲ μg/mL، ۴ μg/mL، ۱/۹۸ μg/mL و ۱۶ μg/mL - ۰/۵ بود. میزان مقاومت نسبت به داروی کتوکونازول در شیراز، ایلام و ترکیه به ترتیب ۷ درصد (۱۶)، ۳۴/۹ درصد (۴) و ۳۲ درصد (۲۱) گزارش شده است (که دو نرخ اول متعلق به شیراز است). در مطالعه حاضر، میزان MIC<sub>50</sub> کتوکونازول برای همه این ایزوله‌ها ۰/۳۱ μg/mL بود. میزان مقاومت به داروی کتوکونازول در مطالعه رزاقی و همکاران ۳۴ درصد (۲۳)، مطالعه کتیرایی و همکاران (۲۰۱۵)

۴۷ درصد (۲۴) و جعفریان و همکاران (۲۵) ۴۷/۵ درصد گزارش گردید، درحالی که میزان مقاومت به داروی کتوکونازول در مطالعه حاضر ۲/۱۲ درصد است. تفاوت در منشأ ایزوله‌های جمع‌آوری شده از اصلی‌ترین علل تفاوت در نتایج مطالعه ما با مطالعات اشاره شده است. در مطالعه رزاقی و همکاران ایزوله‌های کانیدیا بیشتر از ضایعات ناخن و در مطالعه کتیرایی و همکاران از ضایعات مری افراد مبتلا به ایدز تحت درمان با داروی فلوکونازول جمع‌آوری شده بود (۲۴)، (۲۳).

میزان دامنه MIC برای داروی نیستاتین در مطالعه رزاقی و همکاران (۲۰۱۴) ۱۶-۲  $\mu\text{g/mL}$  (۲۳)، سمعی و همکاران (۲۰۱۴) ۲  $\mu\text{g/mL}$  (۲۷) گزارش گردید. نتایج مطالعه حاضر برای نیستاتین برای همه ایزوله‌های آزمایش شده،  $\text{MIC}=2 \mu\text{g/mL}$  و تنها یک ایزوله از کانیدیا واجد  $\text{MIC}\geq 16$  بود. نتایج مطالعه کتیرایی و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که همه ایزوله‌ها نسبت به نیستاتین ( $\mu\text{g/mL}$ )  $\text{MIC}_{50}=0.125$  حساس بودند که نتایج آنان با مطالعه حاضر تقریباً مطابقت دارد (۲۴). میزان مقاومت به داروی نیستاتین در مطالعه موسوی و همکاران (۲۰۱۹) ۱۴/۲۸ درصد گزارش شد (۱۹). جعفریان و همکاران (۲۰۲۰) دامنه  $\text{MIC}=8-2 \mu\text{g/ml}$  را برای داروی نیستاتین علیه گونه‌های کانیدیا جداشده از مری تعیین کردند (۲۵) که نتایج مطالعه آنان با مطالعه حاضر مطابقت دارد. امیررجب و همکاران (۲۰۱۶) ژئومتریک مین داروی کتوکونازول علیه گونه کانیدیا را  $1.85 \mu\text{g/ml}$  گزارش نمودند (۲۸)، درحالی‌که در مطالعه حاضر این میزان  $0.37 \mu\text{g/ml}$  است. در مطالعه امیررجب و همکاران (۲۰۱۶)، همه ایزوله‌های بررسی شده از نوع کانیدیا گلابراتا بود. ژئومتریک مین داروی کتوکونازول و نیستاتین برای همه ایزوله‌های کانیدیا در مطالعه شکوهی و همکاران (۲۰۲۰) به ترتیب  $0.28 \mu\text{g/ml}$  و  $0.88 \mu\text{g/ml}$  گزارش شد (۲۹)، درحالی که ژئومتریک مین این دو دارو در مطالعه حاضر به ترتیب  $0.37 \mu\text{g/ml}$  و  $1/98 \mu\text{g/ml}$  است. کرمانی و همکاران (۲۰۲۱) کمترین مقدار  $\mu\text{g/ml}$   $\text{MIC}_{50}=0.032$  را برای داروی کتوکونازول در برابر

ایزوله‌های کانیدیا آلبيکنس، کانیدیا گلابراتا و کانیدیا تروپیکاليس گزارش کردند (۳۰)؛ درحالی که این میزان برای داروی نیستاتین  $\text{MIC}_{50}=2 \mu\text{g/ml}$  گزارش گردید که با نتایج مطالعه حاضر تقریباً مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، میان گونه‌های کانیدیا و ارزیابی حساسیت دارویی آن‌ها نسبت به داروهای کتوکونازول و نیستاتین ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $P<0.05$ ) که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد (۳۰)، (۲۹). خلاصه‌ای از حساسیت ایزوله‌های بالینی کانیدیا نسبت به دو داروی نیستاتین و کتوکونازول در مطالعات مختلف انجام شده از ایران در جدول شماره ۲ ارائه گردید. میزان دامنه MIC به دست آمده در مطالعه حاضر با بیشتر مطالعات انجام شده در ایران (جدول شماره ۲) مطابقت دارد و اختلافات گزارش شده بسیار جزئی است. این تفاوت به سبب توزیع فراوانی گونه‌های مختلف کانیدیا، بروز منطقه‌ای کانیدیازیس، دموگرافیک بیماران، شرایط بیماری زمینه‌ای به ویژه بیماران با نقص سیستم ایمنی و مقاومت به داروهای ضدقارچ است..

در مطالعه ما، بیشترین فراوانی گونه‌های ایزوله شده مربوط به کانیدیا آلبيکنس و سپس کانیدیا کروزی بود. بر اساس نتایج مطالعه ما، برای ایزوله‌های کانیدیا داروی کتوکونازول بسیار مؤثرتر از نیستاتین است. الگوی مقاومت دارویی بیانگر تأثیر بهتر کتوکونازول نسبت به نیستاتین است.

### سپاس‌گزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی فارچ‌شناسی دانشکده علوم پزشکی مربوط به خانم نیوشا کاوه به راهنمایی آقایان دکتر محمدتقی هدایتی و دکتر آیت‌الله نصرالهی عمران در دانشگاه علوم پزشکی مازندران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن است..

### تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان اعلام می‌کنند که نتایج این تحقیق با منافع هیچ سازمان یا فردی تعارض ندارد.

### کد اخلاق

این مطالعه در دانشگاه آزاد واحد تنکابن و با کد اخلاق IR.IAU.TON.REC.1401.009 به تصویب رسیده



است.

### سهیم نویسندگان

دکتر محمد تقی هدایتی طرح اولیه مطالعه را مطرح و راهنمایی آن را با دکتر آیت الله نصراللهی عمران بر عهده داشتند، اجرای مطالعه و نوشتن متن اولیه مقاله توسط خانم نیوشا کاوه، آنالیزهای آماری و سازماندهی مطالب توسط دکتر مجتبی تقی زاده و مشاوران علمی و کمک به انجام بهتر تحقیق توسط آقایان دکتر سعید مهدوی عمران و دکتر مهدی عباس تبار انجام شد. متن نهایی با همکاری همه محققین صورت گرفت.

## References

1. Arastehfar A, Khodavaisy S, Daneshnia F, Najafzadeh MJ, Mahmoudi S, Charsizadeh A, et al. Molecular identification, genotypic diversity, antifungal susceptibility, and clinical outcomes of infections caused by clinically underrated yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: an Iranian multicenter study (2014–2019). *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9:264-75. doi: 10.3389/fcimb.2019.00264.
2. Hedayati MT, Armaki MT, Charati JY, Hedayati N, Seyedmousavi S, Denning DW. Burden of fungal infections in Iran. *J Infect Dev Ctries* 2018;12:910-18. doi: 10.3855/jidc.10476.
3. Mahdavi Omran S, Rezaei Dastjerdi M, Zuashkiani M, Moqarabzadeh V, Taghizadeh-Armaki M. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from Iranian patients with denture stomatitis. *Biomed Res Int* 2018; 2018:3086586. doi: 10.1155/2018/3086586.
4. Fazeli A, Kordbacheh P, Nazari A, Ghazvini RD, Mirhendi H, Safara M, et al. Candiduria in hospitalized patients and identification of isolated *Candida* species by morphological and molecular methods in Ilam, Iran. *Iran J Public Health* 2019;48:156-61.
5. Aghili S R , Abastabar M , Soleimani A , Haghani I , Azizi S. High prevalence of asymptomatic nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* among hospitalized patients with heart failure: a matter of some concern? *Curr Med Mycol* 2020;6:1-8. doi: 10.18502/cmm.6.4.5327.
6. Sinh CT, Loi CB, Minh NTN, Lam NN, Quang DX, Quyet D, et al. Species Distribution and Antifungal Susceptibility Pattern of *Candida* Recovered from Intensive Care Unit Patients, Vietnam National Hospital of Burn (2017–2019). *Mycopathologia* 2021;186: 543-51. doi: 10.1007/s11046-021-00569-7.
7. Khadka S, Sherchand JB, Pokhrel BM, Parajuli K, Mishra SK, Sharma S, et al. Isolation, speciation and antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from various clinical specimens at a tertiary care hospital, Nepal. *BMC Res Notes* 2017;10:1-5. doi: 10.1186/s13104-017-2547-3.
8. Khan M, Ahmed J, Gul A, Ikram A, Lalani FK. Antifungal susceptibility testing of vulvovaginal *Candida* species among women attending antenatal clinic in tertiary care hospitals of Peshawar. *Infect Drug Resist* 2018;11:447-56. doi: 10.2147/IDR.S153116.
9. Nenoff , P Krüger C, Neumeister C, Schwantes U, Koch D. In vitro susceptibility testing of yeasts to nystatin–low minimum inhibitory concentrations suggest no indication of in vitro resistance of *Candida albicans*, *Candida* species or non-*Candida* yeast species to nystatin. *Clin and Med Invest* 2016;1:71-6. doi: 10.15761/CMI.1000116.
10. Rezaei-Matehkolaei A, Shafiei S, Zarei-Mahmoudabadi A. Isolation, molecular identification, and antifungal susceptibility profiles of vaginal isolates of *Candida* species. *Iran J Microbiol* 2016;8:410-17.
11. Abastabar M, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Shidfar MR, Kordbacheh P, Makimura K. Restriction analysis of  $\beta$ -tubulin gene for differentiation of the common pathogenic dermatophytes. *J Clin Lab Anal* 2014;28:91-6. doi 10.1002/jcla.21649.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard–3Th Ed: M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 4th Ed. M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2017
14. Berkow E L, Lockhart SH R, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev* 2020; 33: e00069-19. doi: 10.1128/CMR.00069-19.
15. Mohammadi F, Hemmat N, Bajalan Z, Javadi A. Analysis of Biofilm-Related Genes and Antifungal Susceptibility Pattern of Vaginal *Candida albicans* and Non-*Candida albicans* Species. *Biomed Res Int* 2021; 28:2021:5598907 . doi: 10.1155/2021/5598907.
16. Badiie P, Alborzi A. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. *Iran J Microbiol* 2011;3:183- 8.
17. Shokouhi T, Bandalizdeh Z, Hedayati MT, Mayahi S. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. *Jundishapur J Microbiol* 2011; 4: S19-S26.
18. Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol* 2013;51:657-63. doi: 10.3109/13693786.2013.770603.
19. Hamzehee S, Kalantar-Neyestanaki D, Afshari SAK, Mousavi SAA. Molecular identification of *Candida* species, assessment of the antifungal susceptibility and the genetic relationship of *Candida albicans* isolated from immunocompromised patients in Kerman,

- Iran. Gene Rep 2019;17:100484 .doi: 10.1016/j.genrep.2019.100484.
20. Mohamadi J, Motaghi M. Anti-fungal resistance in candida isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation* 2014;10:667-70. doi: 10.6026/97320630010667.
  21. Yenisehirli G, Bulut N, Yenisehirli A, Bulut Y. In vitro susceptibilities of *Candida albicans* isolates to antifungal agents in Tokat, Turkey. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8:e28057. doi: 10.5812/jjm.28057.
  22. Badiee P, Badali H, Boekhout T, Diba K, Moghadam AG, Nasab AH, et al. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from the immunocompromised patients admitted to ten university hospitals in Iran: comparison of colonizing and infecting isolates. *BMC Infect Dis* 2017;17:727. doi: 10.1186/s12879-017-2825-7.
  23. Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, Alirezaee M, Shams-Ghahfarokhi M, Amani A, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med* 2014;24:e43-e50. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.004.
  24. Katirae F, Teifoori F, Soltani M. Emergence of azole-resistant *Candida* species in AIDS patients with oropharyngeal Candidiasis in Iran. *Curr Med Mycol* 2015;1:11-16. doi: 10.18869/acadpub.cmm.1.3.11
  25. Jafarian H, Gharaghani M, Seyedian SS, Mahmoudabadi AZ. Genotyping, antifungal susceptibility, enzymatic activity, and phenotypic variation in *Candida albicans* from esophageal candidiasis. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23826. doi: 10.1002/jcla.23826.
  26. Lotfali E, Cheraghi Z, Farzaneh Y, Dehbashi Z, Dorriani M, Keymaram M, et al. Antifungal susceptibility to azoles drugs in *Candida* species isolated from patients with onychomycosis. *J Cosmet Dermatol Cosmet* 2021;12:91-100.
  27. Samiei F, Ajudani Far H, Moazeni M. Molecular identification and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolated from Vulvovaginitis Candidiasis. *Int J Mol Clin Microbiol* 2014;4:383-8.
  28. Amirrajab N, Badali H, Didehdar M, Afsarian MH, Mohammadi R, Lotfi N, et al. In vitro activities of six antifungal drugs against *Candida glabrata* isolates: an emerging pathogen. *Jundishapur J Microbiol* 2016;9:e36638. doi: 10.5812/jjm.36638.
  29. Shokoohi G, Rasekh-Jahromi A, Solhjoo K, Hasannezhad A, Nouripour-Sisakht S, Ahmadi B, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from vulvovaginitis in Jahrom City, south of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2020;13:e106825. doi:10.5812/jjm.106825.
  30. Kermani F, Sadeghian M, Shokohi T, Hashemi S, Moslemi D, Davodian S, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from oral lesions in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Curr Med Mycol* 2021;7:44-50. doi: 10.18502/cmm.7.1.6242. 10.18502/CMM.7.1.6242
  31. Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. *Curr Med Mycol* 2016;2:1.7 .doi: 10.18869/acadpub.cmm.2.2.4.
  32. Hashemi SE, Shokohi T, Abastabar M, Aslani N, Ghadamzadeh M, Haghani I. Species distribution and susceptibility profiles of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis, emergence of *C. lusitanae*. *Curr Med Mycol* 2019;5:26-34. doi: 10.18502/cmm.5.4.2062.