

Effects of Acetic Acid Vaginal Gel on Vulvovaginal Candidiasis: A Double Blind Randomized Controlled Trial

Zahra Rahmani¹,
Sara Sadeghi²,
Roghieh Mirzakhani³,
Marzieh Zamaniyan^{4,5},
Mahdi Abastabar⁶,
Jafar Akbari⁷,
Firozeh Kermani⁸,
Mohamad Khademlo⁹,
Tahereh Shokohi¹⁰

¹ Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Resident in Gynecology, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ MSc Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Infertility Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Medical Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ PhD Student in Medical Mycology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁹ Associate Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

¹⁰ Professor, Department of Medical Mycology, Invasive Fungi Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 5, 2019 ; Accepted March 16, 2020)

Abstract

Background and purpose: It is estimated that 70–75% of women experience one episode of vulvovaginal candidiasis (VVC) during childbearing age and 40-50% suffer from recurrent VVC. Because of the resistance of *Candida* species to certain drugs, such as azoles, physicians tend to use complementary or alternative medicine such as vinegar in treatment of VVC. The current study aimed to determine the therapeutic effects of acetic acid vaginal gel on VVC.

Materials and methods: A double-blind randomized clinical trial was done in women (n=41) with VVC in Sari, Iran. The patients were allocated into two treatment groups to receive either 2% acetic acid vaginal gel + 2% acetic acid intravaginal wash + clotrimazole vaginal cream (n=20) or 2% acetic acid intravaginal wash + clotrimazole vaginal cream (n=21) for 10 days. After treatment, clinical symptoms and mycological cure rate were assessed by culture of vaginal secretions. All yeast isolates were identified by molecular method.

Results: Before the intervention, there were no significant differences in signs and symptoms ($P=0.703$), fungal burden rate (low, medium, heavy) ($P=0.092$), and causative *Candida* species ($P=0.188$) between the two groups. After treatment, an improvement in symptoms was seen in case group but the difference was not significant ($P=0.3512$). A significant difference was found between the two groups in mycological cure rate ($P=0.0377$). *Candida albicans* were the most common species causing the disease.

Conclusion: The study showed that acetic acid vaginal gel could have a significant effect on the definitive cure of VVC.

(Clinical Trials Registry Number: IRCT20190309042978N3)

Keywords: vulvovaginal candidiasis, treatment, acetic acid, vaginal washing, vaginal gel, randomized controlled clinical trial

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 30 (184): 28-39 (Persian).

* Corresponding Author: Tahereh Shokohi - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
(E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com)

اثر ژل واژینال اسیداستیک در درمان ولوواژینیت کاندیدایی: یک کار آزمایی بالینی تصادفی دو سو کور

زهرا رحمانی¹
سارا صادقی²
رقیه میرزاخانی³
مرضیه زمانیان^{4,5}
مهدی عباس تبار⁶
جعفر اکبری⁷
فیروزه کرمانی⁸
محمد خادملو⁹
طاهره شکوهی¹⁰

چکیده

سابقه و هدف: 75-70 درصد زنان بالغ سالم حداقل یک بار در طول دوران باروری ولوواژینیت کاندیدایی را تجربه می کنند و 50-40 درصد دچار عود مکرر می شوند. بدلیل مقاومت گونه های کاندیدا در برابر برخی داروها مانند آزولها، پزشکان به طب مکمل مانند استفاده از سرکه تمایل دارند. ازاین رو مطالعه حاضر به اثرات ژل اسید استیک در درمان ولوواژینال کاندیدایزیس پرداخت.

مواد و روش ها: این مطالعه کار آزمایی بالینی تصادفی دو سو کور بر روی زنان مراجعه کننده به کلینیک های زنان و زایمان شهرساری که دارای علائم عفونت کاندیدایی واژن تایید شده بودند، انجام پذیرفت. 41 بیمار در دو گروه درمانی شامل: ژل واژینال اسیداستیک 2 درصد + شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد + کرم واژینال کلوتریمازول (20 نفر در گروه مورد) و شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد + کرم واژینال کلوتریمازول (21 نفر در گروه شاهد) به مدت 10 روز تحت درمان قرار گرفتند. سپس بهبودی از نظر علائم بالینی و آزمایشگاهی ارزیابی و گونه های مخمری جدا شده با روش مولکولی شناسایی شد.

یافته ها: قبل از مداخله بین دو گروه مورد و شاهد اختلاف معنی داری از نظر علائم بالینی ($P=0/703$)، میزان بارقارچی ($P=0/092$) و گونه کاندیدا ($P=0/188$) مشاهده نشد. بعد از 10 روز درمان بهبودی علائم در گروه مورد مشاهده شد ولی به لحاظ آماری معنی دار نبود ($P=0/3512$). اختلاف معنی داری در میزان بهبودی از نظر قارچ شناسی در دو گروه مشاهده شد ($P=0/0377$). کاندیدا آلبیکنس رایج ترین عامل بیماری بود.

استنتاج: این مطالعه نشان داد ژل استیک اسید می تواند تاثیر بسزایی در بهبود قطعی بیماری داشته باشد.

شماره ثبت کار آزمایی بالینی: IRCT20190309042978N3

واژه های کلیدی: ولوواژینیت کاندیدایی، درمان، اسید استیک، شستشوی داخل واژنی، ژل داخل واژنی، کار آزمایی تصادفی

مقدمه

ولوواژینیت کاندیدایی دومین عفونت شایع واژن است و در 80 تا 85 درصد موارد ناشی از کاندیدا آلبیکنس می باشد (1). شیوع موارد ولوواژینیت کاندیدایی ناشی از گونه های غیر آلبیکنس 30-10 درصد

مؤلف مسئول: طاهره شکوهی - ساری: 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی E-mail: shokohi.tahereh@gmail.com

1. استادیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. رزیدنت زنان و زایمان، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
4. مرکز تحقیقات دیابت، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
5. مرکز ناباروری، گروه زنان و زایمان، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
6. استادیار، گروه قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
7. استاد، گروه فارموسوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
8. دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
9. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
10. استاد، گروه قارچ شناسی، مرکز تحقیقات قارچ های تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1398/10/15 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/10/17 تاریخ تصویب: 1398/12/26

آلیککس نشان دادند(11). در یک مدل استوماتیت ناشی از دندان مصنوعی نیز فعالیت ضد قارچی سرکه سیب از نظر کاهش قدرت چسبیدن و تخریب، قابل مقایسه با نیستاتین دانسته شد(12). از دیرباز شستشو (دوش) واژن با ترکیبات مختلف از جمله سرکه (اسید استیک 5 درصد) در بسیار از کشورها به عنوان درمان خانگی ولوواژینیت کاندیدی در اکثر بیماران است(13). اخیراً در گزارش یک موردی درمان موفق ولوواژینیت کاندیدی مزمن و عودکننده با استفاده از سرکه سیب(14) و در مطالعه مورد شاهدهی اثر دوش سرکه و جوش شیرین در درمان مورد مقایسه قرار گرفته است(15). چون تاکنون پژوهش‌های محدود و بعضاً با اعتبار کم در این زمینه انجام شده است و با توجه به اهمیت درمان جایگزین ولوواژینیت کاندیدی، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات ژل اسید استیک در درمان ولوواژینیت کاندیدی به صورت یک کارآزمایی بالینی تصادفی دو سوکور در مقایسه با داروی متداول در زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان بیمارستان امام خمینی و کلینیک تخصصی باغبان ساری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی دو سوکور است که بر روی زنان دارای علائم عفونت کاندیدی واژن و نتایج (آزمایش مستقیم و کشت) مثبت که در سال 1396 به درمانگاه زنان بیمارستان امام خمینی و درمانگاه تخصصی طبوبی شهر ساری مراجعه نمودند، انجام شد. این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی با دریافت کد IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1397.1349 و در کمیته اخلاق پژوهش‌های کارآزمایی بالینی با شماره IRCT20190309042978N3 ثبت گردید. با توجه به این که تشخیص سریع در جهت درمان به موقع بیمار با داروهای مناسب قسمتی از فرایند مراقبت‌های

گزارش شده است، اما در سال‌های اخیر افزایش قابل توجهی در عفونت با گونه‌های غیر آلیککس به خصوص کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس مشاهده شده است. این افزایش می‌تواند به علت استفاده گسترده و نابجای آزول‌ها، خوددرمانی و استفاده مکرر و طولانی مدت داروها باشد(2-4). داروهای آزولی قادر به جلوگیری از عود عفونت نیستند و از آن‌جا که فقط بر روی گونه‌های خاصی از کاندیدا اثر می‌کنند، باعث تغییر فلور نرمال واژن و رشد بیش از حد گونه‌های دیگر کاندیدا می‌شوند(5). در نتیجه عدم انتخاب درمان مناسب باعث عود مجدد ولوواژینیت کاندیدی شده و این سیکل معیوب بدون نتیجه‌گیری استمرار یافته حالت ناامیدی را برای بیمار و پزشک به وجود می‌آورد. در حال حاضر در درمان کاندیدایزیس، داروهای سنتتیک تجاری به طور رایج مورد استفاده قرار می‌گیرند. ولی بروز عوارض جانبی و ظهور مقاومت دارویی در میان گونه‌های قارچی، پژوهشگران را تشویق به یافتن ترکیبات و طراحی داروهای جدید برای جایگزینی با داروهای قبلی می‌نماید. روش‌های غیر دارویی شامل استفاده از مواد طبیعی مانند اسید کاپریک، اسید بوریک، استفاده از لاکتوباسیل‌های اسیدوفیلوس، سرکه درمانی، ماست درمانی و عصاره‌های گیاهی می‌باشد(6-8). امروزه مطالعات زیادی بر روی ترکیبات و داروهای گیاهی در حال انجام است. احتمالاً این نوع ترکیبات، قابل اطمینان‌تر و ایمن‌تر از ترکیبات با منشأ غیرطبیعی می‌باشند(9). در مطالعات آزمایشگاهی اثرات مهارکنندگی چهار نوع ماده ضد عفونی‌کننده علیه همه میکروارگانیسم‌های مسبب واژنیت جهت دوش (شستشو) واژن در موارد واژینوز باکتریایی، واژینیت استرپتوکوکوکی گروه B و کاندیدایزیس ولوواژن بررسی و سرکه (اسید استیک 5 درصد) به عنوان ماده‌ای غیرمضر و احتمالاً مفید در درمان واژینیت تایید شد(10). اخیراً در مطالعه آزمایشگاهی، خاصیت ضد میکروبی سرکه سیب را علیه بعضی از باکتری‌ها و کاندیدا

پزشکی بیمار است، به منظور جلب اعتماد افراد بیمار قبل از ورود به مطالعه، روش اجرا، هدف از انجام مطالعه، مدت زمان مطالعه و مشکلات احتمالی به بیمار توضیح داده شد و پس از کسب رضایت آگاهانه افراد وارد مطالعه شدند.

خصوصیات بیماران: زنان در سنین باروری (55-18 سالگی) با علایم و نشانه‌های سوزش ادرار، خارش ولوواژن، ترشحات سفید و پنی‌ری شکل واژن که با بررسی‌های آزمایشگاهی عفونت قارچی آن‌ها از نظر کاندیدا مورد تایید قرار گرفته بود، وارد مطالعه شدند. مواردی مانند حاملگی و یا شیردهی، استفاده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، ابتلا به بیماری‌های مقاربتی، ابتلا به دیابت، ابتلا به مواد حساسیت‌زا از جمله سرکه، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات ضد قارچ یا داروهای واژینال در دو هفته گذشته، ابتلا به ولوواژینیت راجعه (چهار یا بیش‌تر از چهار بار ابتلا در طول سال)، استفاده از درمان‌های حمایتی دیگر مثل دوش واژینال و جراحی قریب‌الوقوع از مطالعه خارج شدند.

جامعه آماری این پژوهش همه بیماران مبتلا به کاندیدایازیس ولوواژن براساس آزمایشات مستقیم و کشت بودند که از بین 120 بیمار مراجعه کننده بر اساس معیارهای ورود پس از کسب رضایت آگاهانه و کتبی تعیین و توسط رزیدنت زنان به طور تصادفی در دو گروه درمانی قرار گرفتند. 20 نفر در گروه مورد (ژل واژینال اسیداستیک 2 درصد + شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد + کرم واژینال کلوتریمازول) و 21 نفر در گروه کنترل (شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد + کرم واژینال کلوتریمازول) به مدت 10 روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. به هر دو گروه آموزش لازم در خصوص شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد به صورت چهره به چهره داده شد و پرهیز از مقاربت و یا مقاربت همراه با کاندوم توصیه گردید و از تمامی بیماران تحت درمان خواسته شد در صورت بروز تحریک و تشدید علایم در مدت درمان، به درمانگاه

زنان مراجعه کنند. این مطالعه به صورت دو سوکور طراحی شد به طوری که پزشک معالج و آزمایشگاه از تخصیص نوع درمان به هر یک از گروه‌های درمانی بی اطلاع بودند. پس از دوره درمانی تمامی بیماران توسط پزشک متخصص زنان از نظر وجود علایم و شکایت مورد ارزیابی قرار گرفتند و با استفاده از دو عدد سواب پنبه ای استریل مرطوب شده با نرمال سالین استریل از ترشحات واژن دو باره نمونه‌برداری انجام گرفت و به آزمایشگاه ارسال شد. بهبودی با حذف علایم بالینی و همچنین عدم رشد مخمر یا کاهش کلنی مخمری در محیط کشت مشخص گردید. لازم به ذکر است که ژل واژینال اسید استیک 2 درصد با کمک متخصص فارماسیوتیکس در دانشکده داروسازی تهیه و در اختیار بیماران گروه مورد قرار گرفت.

بررسی آزمایشگاهی: نمونه ترشحات واژن قبل و بعد از درمان با حفظ شرایط سرما در اسرع وقت مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفت. نمونه سواب اول در شرایط استریل بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (SDA, (Merck, Darmstadt, Germany) واجد کلرامفنیکل (Merck, Darmstadt, Germany) و کروم آگار کاندیدا (Quelab LABORATORIES (INC, Montreal Canada) و به ترتیب در 30 و 37 درجه سانتی گراد به مدت دو هفته انکوبه گردید. نمونه سواب دوم بر روی لام منتقل شد و با یک قطره هیدروکسید پتاسیم 10 درصد، سریعاً جهت مشاهده میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. تشخیص ولوواژینیت کاندیدایی با مشاهده سلول‌های مخمری و یا هیف کاذب در آزمایش مستقیم و رشد کلنی‌های مخمری در محیط کشت تائید شد. کشت نیمه کمی با استفاده از یک سواب آغشته به ترشحات بیماران دارای علامت ولوواژینیت در تمامی سطح پلیت تلقیح شده و بدین صورت امتیازدهی شد: در صورت رشد کلنی کم‌تر از 10 عدد کلنی (بار قارچی کم)، تعداد 10 تا 100 عدد (بار قارچی متوسط) و بیش از 100 عدد (بار

(Gene Bank) مورد مقایسه قرار گرفت و بر اساس تطبیق با 99 تا 100 درصد گونه کاندیدا تعیین شد. فرآیند جمع آوری و تحلیل داده‌ها از طریق نرم‌افزار نسخه SPSS-16 انجام شد و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار یا در صورت غیرنرمال بودن به صورت مد بیان شدند. برای توزیع فراوانی در هر گروه از آزمون‌های T مستقل، Anova و آزمون مجذور کای برای مقایسه بین گروهی و درون گروهی استفاده شد. تمامی تست‌های آماری با احتساب فاصله اطمینان 95 درصد و ضریب آلفای 0/05 انجام شدند. در این مطالعه، مقدار P کم‌تر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

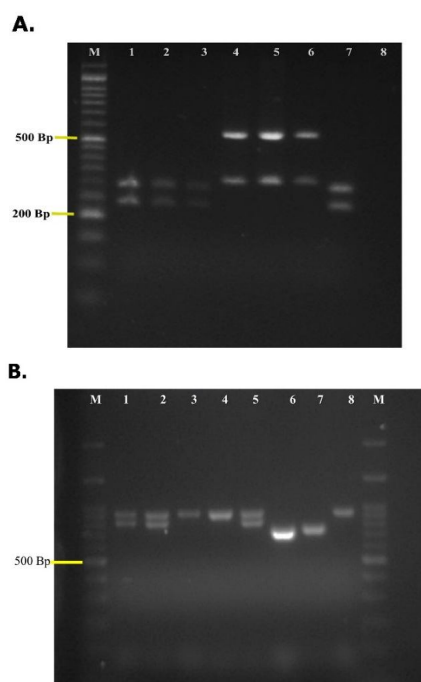
میانگین سنی افراد مورد مطالعه $34/98 \pm 8/87$ سال با حداقل سن 18 و حداکثر سن 55 سال بود. 4 نفر (9/8 درصد) از بیماران سابقه مصرف قرص‌های بارداری حاوی استروژن را داشتند. هیچ‌کدام از افراد مورد مطالعه سابقه استفاده از وسایل جلوگیری داخل رحمی، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی را نداشتند. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه مورد و شاهد در بدو مطالعه، از نظر مصرف قرص ضدبارداری، تعداد اپی‌زودها و تعداد حاملگی‌ها وجود نداشت ($P > 0/05$) (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: میانگین و انحراف استاندارد سن و تعداد حاملگی/فراوانی و درصد فراوانی مصرف قرص‌های ضد بارداری و مدت مصرف دارو و تعداد اپی‌زودها در گروه مورد و شاهد قبل از مداخله دارویی

متغیر	گروه		سطح معنی‌داری
	مورد	شاهد	
سن (سال)	$38/05 \pm 8/07$	$31/62 \pm 8/6$	0/018
تعداد حاملگی	$2/1 \pm 0/85$	$0/85 \pm 0/97$	0/000
مدت زمان مصرف رژیم دارویی (روز)	$7/65 \pm 1/23$	$8/88 \pm 1/69$	0/122
تعداد (درصد)			
مصرف قرص‌های ضد بارداری دارد	3 (15)	1 (4/76)	0/269
	17 (85)	20 (95/24)	
تعداد اپی‌زود	25 (73/5)	37 (88/09)	0/843
	9 (26/47)	5 (11/90)	

قارچی شدید) در نظر گرفته شد. کشت نیمه کمی خصوصاً برای ارزیابی اثر مداخله درمانی بسیار مفید است. تشخیص قطعی کاندیداها با روش‌های کلاسیک شامل تست لوله زایا، تولید کلامیدو کونیدی و تولید کلنی‌های رنگی کاندیدا بر روی محیط کروم آگار انجام شد. استخراج DNA به روش جوشاندن صورت گرفت (16). ناحیه ژنی ITS1-5.8S-ITS2 قطعات DNA ریپوزومی با استفاده از ایزوپرایمرهای یونیورسال قارچی ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') تکثیر گردید. واکنش PCR به‌طور خلاصه، در یک مخلوط شامل بافر واکنش، dNTPs، آنزیم Taq DNA polymerase، پرایمر رفت و برگشت ITS1 و ITS4 نمونه DNA و آب مقطر در دستگاه ترمال سایکلر CR (مدل BIORAD T100) انجام شد. شناسایی گونه‌های کاندیدای جدا شده از موارد ولوواژینیت کاندیدایی، با روش پلی مورفیسم قطعات بعد از هضم آنزیمی (Restriction fragment length polymorphism) محصولات PCR طبق مطالعات قبلی (16) با کمک آنزیم محدودالایتر MspI و بافر آنزیم و آب مقطر به مدت 2 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انجام گردید. جهت مشاهده قطعات حاصل از هضم آنزیمی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز 2 درصد با ولتاژ 80 به مدت 70 دقیقه انجام شد. جهت تمایز گونه‌های کمپلکس کاندیدا آلبیکنس مطابق روش قبلی (17) با استفاده از پرایمر رفت و برگشت (5'-GCTACCACTTCAGAATCATCATC-3') و (5'-GCACCTTCAGTCGTAGAGACG-3') تکثیر بخشی از ژن پروتئین 1 دیواره هایفی (HWP1; hyphal wall proteins) و مشاهده تولید باند 940bp در کاندیدا آلبیکنس و 740bp در کاندیدا آفریکانا انجام پذیرفت. 10 درصد از محصولات PCR جهت تایید نتایج حاصل هضم آنزیمی به شرکت ژن فناوریان برای تعیین توالی فرستاده شد و توالی حاصل با استفاده از نرم‌افزار BLAST با توالی موجود در بانک ژنی

معناداری بیش تر از گروه مورد بوده است ($P=0/010$) (جدول شماره 2). از میان این 6 نفر، 3 نفر بار قارچی متوسط و 3 نفر بار قارچی شدید داشتند ($P>0/05$). در گروه مورد تنها یک بیمار (4/76 درصد) از لحاظ آزمایش مستقیم و کشت مثبت شد و بار قارچی متوسط داشتند. فراوانی و درصد فراوانی علائم گزارش شده بعد از درمان در گروه مورد ترشح (0 درصد) خارش 4 مورد (7/84 درصد) درد در حین مقاربت 3 مورد (5/88 درصد) سوزش 17 مورد (33/33 درصد) بود (جدول شماره 2) و در گروه شاهد ترشح (0 درصد) خارش 3 مورد (5/88 درصد) درد (0 درصد) سوزش 5 مورد (9/8 درصد) بوده که $P=0/351$ داشتند (جدول شماره 2).



تصویر شماره 1: A: الکتروفورز ایزوله های بالینی کاندیدا پس از هضم آنزیمی با *MspI* روی ژل آگارز 2/5 درصد شامل: شماره های 1 تا 3: ک. آلیکنس، شماره 4 تا 6: ک. گلابراتا و شماره 7: ک. آلیکنس. **B:** الکتروفورز محصولات PCR ناحیه ژنی HWP1 بر روی مخمر کاندیدا آلیکنس جدا شده از نمونه ترشحات واژن بیماران به منظور تفکیک کاندیدا آفریکانا روی ژل آگارز 2/5 درصد شامل: شماره های 1-5: ک. آلیکنس، شماره های 6 و 7: ک. آفریکانا و شماره 8: ک. آلیکنس. ردیف M مارکر مولکولی 100 جفت بازی

میانگین زمان مصرف در بین افراد مورد مطالعه $1/51 \pm 8/02$ روز بود. از نظر مدت مصرف رژیم های دارویی بین گروه مورد و شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P=0/122$) (جدول شماره 1). همچنین بین گروه مورد و شاهد در بدو مطالعه از نظر علائم و نشانه ها با آزمون آماری مجذور کای تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P=0/703$) (جدول شماره 2).

بررسی نتایج کشت و آزمایش مستقیم بر روی بیماران نشان داد که همه افراد مورد مطالعه کشت مثبت داشته اند. یک بیمار (2/4 درصد) از گروه شاهد و یک بیمار (2/4 درصد) از گروه مورد با وجود کشت مثبت به دلیل منفی بودن نتیجه آزمایش مستقیم از مطالعه خارج شدند. همانطور که در (جدول شماره 2) ملاحظه می شود از نظر تعداد کلنی و بار قارچی (شدید، متوسط و خفیف) ($P=0/092$) و از نظر گونه کاندیدا مسبب در مبتلایان به ولوواژنیت کاندیدیایی در بین گروه مورد و شاهد در بدو مطالعه اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول شماره 2) ($P=0/188$). در 29 بیمار (70/7 درصد) میزان بار قارچی شدید و نسبت به سایر حالت ها (متوسط و کم) فراوانی بیش تری را نشان داده است ($P<0/001$) (جدول شماره 2). تمامی ایزوله های مخمری با روش PCR-RFLP و تکثیر ناحیه پروتئین 1 دیواره هائیفی در سطح گونه شناسایی شدند (جدول شماره 2) و (تصویر شماره 1 (A و B)). گونه کاندیدا آلیکنس با فراوانی 36 مورد بیش ترین فراوانی را به خود اختصاص داده است ($P<0/001$). آزمون مجذور کای دو نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه مورد و شاهد از نظر تعداد و گونه کاندیدا در بدو مطالعه (قبل از درمان) وجود ندارد (جدول شماره 2). بعد از گذشت حدود 10 روز درمان تنها 6 مورد (14/6 درصد) از نظر کشت و آزمایش مستقیم مثبت شدند که همه آن ها از گروه شاهد شامل 4 مورد (66/7 درصد) (3 مورد ک. آلیکنس و 1 مورد ک. آفریکانا) و 2 مورد (33/3 درصد) ک. گلابراتا بودند. نتایج آماری نشان داد عدم پاسخ به درمان در گروه شاهد به طور

جدول شماره 2: فراوانی، درصد فراوانی، علائم و نشانه ها، تعداد کلنی و گونه کاندیدا مسبب در مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدی به تفکیک گروه های مورد و شاهد قبل از درمان و بعد از درمان

علائم	مورد	شاهد	قبل از درمان		مورد	شاهد	بعد از درمان		سطح معنی داری
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
ترشح	20 (34/48)	17 (33/33)	--	--	3 (5/88)	4 (7/84)	--	--	
خارش	18 (31/03)	14 (27/45)	3 (5/88)	3 (5/88)	3 (5/88)	3 (5/88)	3 (5/88)	3 (5/88)	
درد	1 (1/72)	3 (5/88)	17 (33/33)	17 (33/33)	5 (9/8)	17 (33/33)	5 (9/8)	5 (9/8)	
سوزش	19 (32/76)	17 (33/33)	2 (10)	1 (4/76)	1 (10)	1 (4/76)	1 (10)	1 (4/76)	
تعداد کلنی (بار قارچی)	بین 10 تا 100 کلونی (متوسط)	7 (35)	2 (10)	2 (9/52)	3 (5/88)	1 (4/76)	3 (5/88)	3 (5/88)	0/037
	بیش از 100 کلونی (شدید)	11 (55)	18 (85/71)	18 (85/71)	3 (5/88)	1 (4/76)	3 (5/88)	3 (5/88)	
کرمزگی	1 (5)	2 (10)	2 (9/52)	2 (9/52)	2 (10)	1 (4/76)	2 (10)	2 (10)	
گلایراتا	12 (57/14)	18 (85)	2 (10)	2 (9/52)	3 (5/88)	1 (4/76)	3 (5/88)	3 (5/88)	0/066
آلیکس	3 (14/28)	2 (10)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	
گونه کاندیدا	آلیکس-گلایراتا	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	
	آلیکس-آفریکانا	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	
	آلیکس-فاماتا	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	
	آلیکس-آفریکانا	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	1 (4/76)	

بحث

کاندیدیازیس ولوواژن (VVC) نتیجه رشد بیش از حد یک گونه و یا گونه های مختلف کاندیدا در ناحیه واژن می باشد و زمانی اتفاق می افتد که pH واژن به بیش تر از 4/5 برسد. تخمین زده شده است که 70-75 درصد زنان بالغ سالم حداقل یک بار در طول دوران باروری زندگی خود به ولوواژینیت کاندیدی دچار می شوند.

طی پژوهش های انجام شده در ایران میزان شیوع آن در برخی مناطق 22 درصد گزارش شده است و تقریباً 40-50 درصد حداقل یک بار عود مجدد را تجربه کرده اند (18، 19). واژینیت کاندیدی به ندرت یک عامل تهدید کننده زندگی می باشد ولی نتایج مصیبت باری نظیر ابتلای مکرر، صرف هزینه زیاد و ناباروری را به همراه دارد. در حال حاضر در درمان کاندیدیازیس، داروهای سنتتیک تجاری به طور رایج مورد استفاده قرار می گیرند ولی بروز عوارض جانبی و ظهور مقاومت دارویی در میان گونه های قارچی، پژوهشگران را تشویق به یافتن ترکیبات و طراحی داروهای جدید برای جایگزینی با داروهای قبلی می نماید. استفاده از روش های غیر دارویی و مواد طبیعی مانند اسید کاپریک، اسید بوریک، استفاده از لاکتوباسیل اسیدوفیلوس، سرکه

درمانی، ماست درمانی و عصاره های گیاهی رو به افزایش است (20). کلوتریمازول، میکونازول، نیستاتین و ایتراکونازول به صورت موضعی و فلوکونازول بصورت خوراکی در درمان مورد استفاده قرار می گیرد که اخیراً استفاده از فلوکونازول خوراکی به عنوان درمان موثر پیشنهاد می شود اما همچنان استفاده از داروهای موضعی مورد استقبال متخصصین زنان و زایمان می باشد. از این رو استفاده از داروهای سنتی در جهت کاهش هزینه ها و همچنین خود درمانی مورد استقبال جامعه می باشد (6).

مطالعاتی که در دهه اخیر انجام شده است به وضوح نشان دهنده اثرات ناخوشایند داروهای شیمیایی در کنار اثرات مفید آن ها می باشد (20، 9). به دلیل افزایش مقاومت دارویی گونه های کاندیدا، بروز ولوواژینیت کاندیدی مزمن و عود کننده، عوارض جانبی آزاردهنده و تمایل زنان به استفاده از درمان های طبیعی، در مطالعات اخیر استفاده از درمان های جایگزین مورد توجه بیش تری قرار گرفته است (21). از طرفی درمان های مکرر موارد مزمن و عود کننده می تواند عوارض کبدی و کلیوی را در پی داشته باشد و نیز ممکن است باعث القا مقاومت در قارچ ها نیز شود. در سال های اخیر مصرف پروبیوتیک به عنوان یک استراتژی جدید در برخورد با ولوواژینیت کاندیدی و واژینوز باکتریایی (هم در درمان و هم در

جلوگیری از ابتلا) مطرح شده است (22). یکی از درمان‌های جایگزین، درمان با سرکه است. سرکه حاصل از تخمیر میوه‌های مختلف مثل سیب و انگور و غیره می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای به عنوان درمان مکمل مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای خواص ضد میکروبی نیز است. علی‌رغم این که در تحقیقات استفاده از آن به خوبی ثابت نشده است اما به عنوان یک درمان کمکی برای واژینیت به صورت موضعی به‌عنوان دوش واژینال به‌طور وسیعی تجویز و توسط بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد و معمولاً عوارض استفاده از سرکه را بعید و قابل اغماض در نظر می‌گیرند. اگر چه مکانیزم درمان واژینیت مشخص نیست اما به نظر می‌رسد باعث تغییر pH واژن می‌شود و محیط واژن را برای رشد قارچ‌ها نامساعد می‌سازد. با این حال، این درمان معایبی نیز به دنبال دارد و عمدتاً دارای عوارض جانبی مانند سوزش و یا حتی سوختگی‌های شیمیایی پوست می‌باشد که می‌تواند وضعیت بالینی بیمار را بدتر نماید. بر این اساس سرکه باید با احتیاط استفاده شود (23). انواع مدل‌های درمانی سرکه مانند ژل، لوسیون، شستشو با غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (8، 15، 24). مطالعات گذشته حاکی از اثرات اسیداستیک در درمان واژینیت‌های غیر کاندیدایی مثل واژینیت تریکومونایی با 100 درصد بهبودی می‌باشد (25). همچنین از ژل اسید استیک برای تقویت اسیدیته واژن قبل از درمان با میزوپرستول برای ختم بارداری در سه ماه دوم بارداری استفاده شده که ژل اسید استیک به عنوان یک ترکیب موثر و ایمن برای درمان به همراه با میزوپرستول گزارش شد (8). اسید استیک در تخمیر زایلوز به زایلیتول توسط کاندیدا گیلرموندی نقش داشته است به‌طوری که این مخمر در جذب اسید استیک به عنوان یک عامل سم‌زدا تا غلظت یک گرم در لیتر باعث افزایش تخمیر شده و در کاهش رشد قارچ نیز موثر بوده است (26).

در یک مطالعه آزمایشگاهی، اثرات ضد قارچی سرکه‌های سیب، خرما و انگور در مقایسه با داروی ضد

قارچی فلوکونازول بروی کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا جدا شده از موارد مبتلا به ولوواژینیت کاندیدایی بررسی و اثرات ضد قارچی قابل توجه سرکه انگور و سیب، بر رشد مخمرها گزارش شد (27). در بین کارآزمایی‌های دارویی انجام شده مطالعات معدودی از نظر نوع مداخله با مطالعه ما قابل مقایسه است. یکی از آن مطالعات، کارآزمایی بداغ آبادی و همکاران است (15) که به مقایسه اثر دوش آب سرکه و آب و جوش شیرین بر روی مبتلایان به عفونت کاندیدایی واژن پرداخته و تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های درمانی مشاهده نکردند. لازم به ذکر است که گروه‌های درمانی با مطالعه حاضر همخوانی نداشته ولی نظیر مطالعه حاضر جهت مقایسه دو روش درمان بهبودی آزمایشگاهی و منفی شدن کشت مدنظر قرار گرفته است. در مطالعه حاضر تاثیر ژل اسید استیک در درمان ولوواژینیت کاندیدایی با مقایسه با درمان رایج کلوتریمازول مشهود بود. طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه تنها یک ایزوله کاندیدا آلیکنس بعد از درمان با ژل اسید استیک مشاهده شد که با مطالعه Moosa در بررسی فعالیت داروی ضد قارچ فلوکونازول بر علیه کاندیدا آلیکنس در حضور اسید استیک مشابه بوده هر چند که از لحاظ نوع دارو آزول متفاوت بوده است (28). در مطالعات مختلف اثرات سینرژستیک اسید استیک و فلوکونازول و کاسپوفونژین در مهار رشد کاندیدا آلیکنس و کاندیدا گلابراتا گزارش شده است (28، 29). شایع‌ترین شکل ترکیبی علائم در زنان مبتلا به VVC و RVVC وجود همزمان سوزش و خارش و ترشح می‌باشد به‌طوری که عمده‌ترین علائم گزارش شده در مطالعه حاضر به ترتیب خارش (36/29 درصد)، سوزش (33/03 درصد)، ترشحات غیر طبیعی (33/94 درصد) بوده که با یافته‌های دیگر مطالعات همخوانی دارد (2، 30، 31).

نتایج حاصل از شناسایی گونه‌های جدا شده به روش PCR-RFLP نشان داده است که همچنان کاندیدا آلیکنس به عنوان گونه غالب جداسازی شده از نمونه‌های

کاندیدایزیس ولوواژن بوده و کاندیدا گلابراتا درمقام بعدی قرار دارد. این نتایج مشابه نتایج حاصل از مطالعه قره قانی و همکاران بوده که گونه های غالب جدا شده از نمونه های بالینی شامل کاندیدا آلیکنس (86 درصد) و به دنبال آن ک. گلابراتا (3/77 درصد)، ک. کروزه ای (3 درصد) و در 9 مورد همزمان چند گونه ی کاندیدا (*multiple Candida species*) از نمونه ترشح واژن بیمار جدا شده است (32). نتایج پژوهش های دیگر نیز بیش ترین گونه جدا شده از نمونه بالینی را کاندیدا آلیکنس (86/2 درصد) اختصاص داده و کاندیداهای غیر آلیکنس شامل کاندیدا گلابراتا (7/9 درصد) و کاندیدا کفایر (3/9 درصد) و کاندیدا تروپیکالیس (1/9 درصد) در مرتبه های بعدی بوده است (33).

در مطالعه شکوهی و همکاران نیز گونه های مخمری جدا شده شامل 80/9 درصد گونه کاندیدا آلیکنس و 13 درصد کاندیدا گلابراتا بوده و نقش سایر گونه های مسبب دیگر شامل کاندیدا کروزه ای، کاندیدا کفیر، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس بسیار ناچیز بوده است (34). مطالعات مشابه دیگر در ایران نیز گونه های شایع را به ترتیب کاندیدا آلیکنس (42/5 درصد)، کاندیدا گلابراتا (21/9 درصد) و کاندیدا دابلینینسیس (16/4 درصد) گزارش نمودند و برفرونی جداسازی گونه های کاندیدا غیر آلیکنس نسبت به گونه های آلیکنس تاکید داشتند (2). در مطالعه ای که اخیرا در شهر بابل سر انجام گرفت، شایع ترین گونه جداسازی شده کاندیدا آلیکنس (44/21 درصد) بوده و کاندیدا لوزیتانیا (18/95 درصد)، کاندیدا پاراپسیلوزیس (13/69 درصد) و کاندیدا گلابراتا (8/42 درصد) در مراتب بعدی قرار داشتند. در حالی که روش شناسایی این دو مطالعه مشابه هم بوده است، تفاوت نتایج متاثر از موقعیت جغرافیایی و جمعیت مورد بررسی گزارش گردید. در این مطالعه با توجه به جداسازی گونه نوظهور کاندیدا لوزیتانیا به عنوان شایع ترین گونه بعد از کاندیدا آلیکنس بر انجام بررسی اپیدمیولوژیک نظارتی در راستای

آگاهی از پراکندگی گونه ها و وضعیت حساسیت به داروهای ضد قارچی تاکید گردید (35).

در مطالعه حاضر 3 گونه (9/52 درصد) کاندیدا آفریکانا با استفاده از روش ملکولی (PCR) قطعه ژنی HWP1 از 42 گونه کمپلکس آلیکنس جدا شده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت، شناسایی گردید. این گونه در مطالعاتی در اروپا، آفریقا، آسیا قبلا گزارش شده بود (36-38، 29). در حالی که در ایران در دو مطالعه در سال 2015 (39) و 2019 (35) به ترتیب 4/38 درصد و 2/11 درصد از کمپلکس کاندیدا آلیکنس جداسازی شده از واژن کاندیدا آفریکانا مورد شناسایی قرار گرفت. در مطالعه دیگری در اهواز در سال 2015 یک مورد آفریکانا از نمونه واژن خانم سالم بدون علائم کاندیدی جداسازی گردید (40).

در مطالعه ای در ترکیه از 376 گونه کمپلکس آلیکنس، سه مورد آفریکانا از نمونه واژن جداسازی شد (41). در بررسی دیگری در ترکیه از 195 گونه کمپلکس آلیکنس هیچ موردی از کاندیدا آفریکانا گزارش نگردید و این در حالی است که در برخی از مطالعات مشابه از کشورهای اروپایی از 16-6 درصد بیماران مبتلا به ولوواژینیت ک. آفریکانا جدا شده است (42).

در مطالعه ما تمام افراد با کرم واژینال کلوتریمازول و شستشوی داخل واژنی با اسید استیک 2 درصد به مدت دو هفته تحت درمان قرار گرفتند؛ نکته مورد توجه تاثیر ژل استیک اسید 2 درصد در گروه مورد می باشد. نتایج نشان داد در گروه شاهد پس از اتمام دوره درمان تقریبا یک سوم افراد آزمایش مستقیم و کشت مثبت داشتند. در گروه مورد تنها یک مورد از لحاظ آزمایش مستقیم و کشت مثبت بود. با توجه به افزایش روزافزون موارد مزمن و عودکننده ولوواژینیت کاندیدی، استفاده از داروهای غیر شیمیایی می تواند کمک کننده باشد. در مطالعه حاضر یافته ها نشان داد که ژل استیک اسید می تواند تاثیر بسزایی در بهبود قطعی (منفی شدن کشت) بیماری داشته باشد. با این وجود

میرزاخانی است که با شماره طرح تحقیقاتی 1349 مصوب شده بود. بدینوسیله از تمامی بیماران، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و واحد توسعه بالینی بیمارستان امام خمینی ساری و پرسنل خدوم آزمایشگاه قارچ شناسی کلینیک تخصصی باغبان و گروه قارچ شناسی دانشکده پزشکی که در اجرای این طرح همکاری‌های لازم را داشتند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

پیشنهاد می‌شود مطالعات کارآزمایی تصادفی کنترل شده با حجم نمونه بیش‌تر انجام گیرد تا ارزیابی بهتری ارائه گردد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دوره دستیاری خانم دکتر سارا صادقی و دوره کارشناسی ارشد خانم رقیه

References

- Murina F, Graziottin A, Felice R, Radici GL, Di Francesco S. The recurrent vulvovaginal candidiasis: proposal of a personalized therapeutic protocol. ISRN Obstet Gynecol 2011; 2011.
- Hedayati MT, Taheri Z, Galinimoghadam T, Aghili SR, Charati JY, Mosayebi E. Isolation of different species of Candida in patients with vulvovaginal candidiasis from Sari, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 2015; 8(4).
- Aalei B, Touhidi A. Prevalence of candida vaginitis among symptomatic patients in Kerman. Journal of Qazvin University of Medical Sciences 2000; 13; 42-48.
- Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. J Clin Microbiol 2005; 43(5): 2155-2162.
- Sobel JD. Treatment of vaginal Candida infections. Expert Opin Pharmacother 2002; 3(8): 1059-1065.
- Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2000; 30(4): 662-678.
- Iavazzo C, Gkegkes ID, Zarkada IM, Falagas ME. Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. J Women's Health 2011; 20(8): 1245-1255.
- Abd-El-Maeboud KH, Ghazy A, Ibrahim A, Hassan N, El-Bohoty A, Gamal-El-Din I. Vaginal acidity enhancement with a 3% acetic acid gel prior to misoprostol treatment for pregnancy termination in the midtrimester. Int J Gynecol Obstet 2012; 119(3): 248-252.
- Lisboa C, Santos A, Dias C, Azevedo F, Pina Vaz C, Rodrigues A. Candida balanitis: risk factors. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2010; 24(7): 820-826.
- Pavlova SI, Tao L. In vitro inhibition of commercial douche products against vaginal microflora. Infect Dis Obstet Gynecol 2000; 8(2): 99-104.
- Yagnik D, Serafin V, Shah JA. Antimicrobial activity of apple cider vinegar against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Candida albicans; downregulating cytokine and microbial protein expression. Sci Rep 2018; 8(1): 1-2.
- Mota AC, de Castro RD, de Araújo Oliveira J, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of apple cider vinegar on Candida species involved in denture stomatitis. J Prosthodont 2015; 24(4): 296-302.
- Aral SO, Mosher WD, Cates WJr. Vaginal douching among women of reproductive age

- in the United States: 1988. *Am J Public Health* 1992; 82(2): 210-214.
14. Ozen B, Baser M. Vaginal Candidiasis Infection Treated Using Apple Cider Vinegar: A Case Report. *Altern Ther Health Med* 2017; 23(7): 260-262.
 15. Bodagh Abadi M, Behnam Vashani HR. A comparative study of vinegar solution bath and soda solution bath in the treatment of Candida vaginitis in Sabzevar clinic in 1379-80. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2002; 8(4): 65-71.
 16. Shokohi T, Hashemi Sotey MB, Saltanat Pouri Z, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of Candida species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28(2): 147-151.
 17. Abastabar M, Hosseinpour S, Hedayati MT, Shokohi T, Valadan R, Mirhendi H, et al. Hyphal wall protein 1 gene: A potential marker for the identification of different Candida species and phylogenetic analysis. *Curr Med Mycol* 2016; 2(4): 1-8.
 18. Hasanvand S, Azadegan Qomi H, Kord M, Didehdar M. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility of Candida isolates from women with vulvovaginal candidiasis in northern cities of Khuzestan province, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2017; 10(8): e12804.
 19. Aminimoghaddam S, Batayee SS, Maghsoudnia A, Mohammadi M. Update of Vaginitis for obstetricians: A Review. *Razi Journal of Medical Sciences* 2018; 24(163): 48-57.
 20. Hastings-Tolsma M, Terada M. Complementary medicine use by nurse midwives in the US. *Complement Ther Clin Pract* 2009; 15(4): 212-219.
 21. Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L, Peck SC, Brown AJ. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genetic Biol* 2011; 48(3): 297-305.
 22. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & febiger; 1992, 81-104.
 23. Felix TC, de Brito Röder DVD, dos Santos pedroso R. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. *Folia Microbiol* 2019; 64(2): 133-141.
 24. Wilson JD, Shann S, Brady SK, Mammen-Tobin AG, Evans AL, Lee RA. Recurrent bacterial vaginosis: the use of maintenance acidic vaginal gel following treatment. *Int J STD AIDS* 2005; 16(11): 736-738.
 25. Aghajani Delavr M. Effect of the concentrated water and salt and diluted vinegar on the treatment of Trichomoniasis vaginitis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 1996; 6(12): 78-97.
 26. Felipe MG, Vieira DC, Vitolo M, Silva SS, Roberto IC, Manchilha IM. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *J Basic Microbiol* 1995; 35(3): 171-177.
 27. Bagheri M, Mahmoudi Rad M, Mansouri A, Younespour S, Taheripناه, R. A comparison between antifungal effect of *Fumaria officinalis*, *Echinacea angustifolia*, vinegar, and fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from vagina candidiasis. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 2015; 17(136): 1-9.
 28. Moosa MY, Sobel JD, Elhalis H, Du W, Akins RA. Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium. *Antimicrob agents chemother* 2004; 48(1): 161-167.

29. Ullah A, Chandrasekaran G, Brul S, Smits GJ. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Front Microbiol* 2013; 4: 142.
30. Nazeri M, Mesdaghnia E, Moravej SAR, Atabakhshiyani R, Soleymani F. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and frequency of *Candida* species in women. *J Mazand Univ Med Sci* 2012; 21(86): 254-262.
31. Tarry W, Fisher M, Shen S, Mawhinney M. *Candida albicans*: the estrogen target for vaginal colonization. *J Surg Res* 2005; 129(2): 278-282.
32. Gharaghani M, Ahmadi B, Sisakht MT, Ilami O, Aramesh S, Mouhamadi F, et al. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis patients by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in Yasuj southwestern Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2018; 11(8): e65359.
33. Roshan R, Sabokbar A, Badali H. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis using PCR-RFLP. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 2014; 4(2): 406-410.
34. Shokohi T. Survey of *Candida* Vulvovaginitis in Outpatients Referred to Gynecology-Obstetrics Clinics of Sari. (1993-94). *J Guilan Univ Med Sci* 1996; 18-19(5): 22-27.
35. 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(4): 26-34.
36. Sharma C, Muralidhar S, Xu J, Meis JF, Chowdhary A. Multilocus sequence typing of *Candida africana* from patients with vulvovaginal candidiasis in New Delhi, India. *Mycoses* 2014; 57(9): 544-552.
37. Shan Y, Fan S, Liu X, Li J. Prevalence of *Candida albicans*-closely related yeasts, *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology* 2014; 52(6): 636-640.
38. Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano FJ, Guarro J, Pontón J, et al. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Med Mycol* 2008; 46(2): 167-170.
39. Yazdanparast SA, Khodavaissy S, Fakhim H, Shokohi T, Haghani I, Nabili M, et al. Molecular characterization of highly susceptible *Candida africana* from vulvovaginal candidiasis. *Mycopathologia* 2015; 180(5-6): 317-323.
40. Seifi Z, Mahmoudabadi AZ. *Candida africana*, a first case from Iran, susceptibility to antifungals, evaluation extracellular enzymes and biofilm formation. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2013.
41. Hazirolan G, Altun HU, Gumral R, Gursoy N, Otlu B, Sancak B. Prevalence of *Candida africana* and *Candida dubliniensis*, in vulvovaginal candidiasis: first Turkish *Candida africana* isolates from vulvovaginal candidiasis. *Journal de Mycologie Médicale* 2017; 27(3): 376-381.
42. Borman AM, Szekely A, Linton CJ, Palmer MD, Brown P, Johnson EM. Epidemiology, antifungal susceptibility, and pathogenicity of *Candida africana* isolates from the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2013; 51(3): 967-972.