

DOI: 10.52705/2788-6190-2024-02-13
УДК 618.15/16-002:616.992.282-039:612.017.1

Особливості мікроскопії вагінального мазка у жінок із рецидивуючим вувльовагінальним кандидозом

Н. Я. Ратушняк

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика,
м. Київ

Мета дослідження: визначити особливості мікробіоти піхви у пацієнток із рецидивуючим вувльовагінальним кандидозом (РВВК).

Матеріали та методи. Проведено проспективне дослідження та клініко-лабораторний аналіз мікробіоценозу піхви у жінок із РВВК. До основної групи включено 70 жінок репродуктивного віку із РВВК та 40 здорових жінок репродуктивного віку, які увійшли до контрольної групи. Обсяг дослідження – оцінка мікробіоценозу піхви за даними мікроскопії мазка, пофарбованого за Грамом, культуральне дослідження вагінальних виділень

Результати. Встановлено, що у 52 (72,8%) жінок діагностовано класичний варіант вувльовагінального кандидозу (ВВК), коли дріжджові гриби вегетують на тлі нормальної мікрофлори, тобто абсолютного домінування лактобактерій. У 18 (25,7%) пацієнток виявлено поєднання ВВК з бактеріальним вагінозом (БВ). Серед епітеліальних клітин переважали поверхневі (100,0% у 70 жінок), у 51 (72,8%) пацієнтки поверхневі клітини поєднувалися з проміжними. У 2 пацієнток (2,8%) виявлено парабазальні епітеліальні клітини. Фонова мікрофлора у пацієнток із ВВК була однорідною, домінували морфотипи лактобацил, у жінок із поєднаною формою ВВК з БВ переважали морфотипи анаеробів та гарднерелли. У пацієнток з РВВК переважала помірна та виражена лейкоцитарна реакція, яка спостерігалася у 66 (94,2%) випадків, у 4 (5,7%) жінок лейкоцити були відсутні або були поодинокі в препараті.

Висновки. При РВВК загальна кількість мікроорганізмів у 19 (27,2%) пацієнток була помірною та становила від 10^1 до 10^2 мікробних клітин у полі зору, у 33 (47,1%) – великою – 10^2 – 10^3 мікробних клітин у полі зору. У пацієнток із поєднаною формою ВВК кількість мікроорганізмів перевищувала 10^3 мікробних клітин у полі зору, також переважала помірна та виражена лейкоцитарна реакція, яка спостерігалася у 66 (94,2%) випадків.

Перинатологія та репродуктологія: від наукових досліджень до практики | **Perinatology and reproductology:** from research to practice

Найчастішим збудником кандидозної інфекції є *C. albicans* (84,2%), друге місце посідає *Candida glabrata* (11,4%).

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи. На проведення дослідження отримано інформовану згоду жінок.

Ключові слова: стан мікробіоценозу піхви, вульвовагінальний кандидоз, мікроскопія вагінального мазка, мікробні клітини, кандидозна інфекція.

Вивчення епідеміологічної ситуації в нашій країні та за кордоном свідчить про високу соціальну значущість кандидозної інфекції, оскільки вона відіграє істотну роль у розвитку запальних процесів нижнього відділу геніталій, невиношування вагітності, передчасних пологів та народження дітей з низькою масою тіла [1–6].

Захворюваність на вульвовагінальний кандидоз (ВВК) за останні 20 років різко зросла. Сьогодні вона посідає друге місце після бактеріального вагінозу (БВ). Дані низки авторів свідчать, що ВВК є однією з найпоширеніших причин звернення пацієнток до гінеколога і посідає перше місце у структурі вагінітів [1, 2, 6–8]. За даними різних авторів, від 15 до 400/0 інфекційних уражень вульви та піхви обумовлені грибовою інфекцією [1, 3, 9, 10]. Близько 75% жінок страждають на це захворювання принаймні один раз протягом життя, 40–450/0 пацієнток протягом свого життя переносять два епізоди захворювання або більше. Водночас 10–200/0 жінок є безсимптомними носіями грибів, при цьому гриби найчастіше локалізуються у піхві; у вагітних колонізація піхви грибами може сягати 40% [2, 7, 10–18]. За даними С. Wilson [19], приблизно 75% жіночого населення США переносять як мінімум один епізод кандидозного вульвовагініту в репродуктивному віці. Від 400/0 до 500/0 жінок мають рецидиви вульвовагініту, а у 5–8% захворювання переходить у хронічну форму [2, 7, 10, 15, 18].

Поширеність рецидивуючих форм кандидозу у світі становить близько 3 млн випадків на рік і збільшується порівняно з попередніми роками. Очікується, що захворюваність на ВВК зростатиме і надалі у зв'язку зі зростанням інфікування *Candida He-albicans* (резистентних до більшості протигрибкових препаратів), а також внаслідок розвитку резистентності до протигрибкових препаратів [6, 8, 20–25].

Основними методами діагностики ВВК є мікробіологічні методи дослідження: мікроскопічний та культуральний. Простим методом виявлення грибів при цьому захворюванні є мікроскопічне дослідження вагінального мазка, пофарбованого за Грамом. Мікроскопічне дослідження є найбільш доступним методом діагностики ВВК, який легко здійснити в амбулаторно-поліклінічних умовах [25–28].

Мета дослідження: визначити особливості мікробіоти піхви у пацієнток із рецидивуючим вульвовагінальним кандидозом (РВВК).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

До основної групи (ОГ) включено 70 жінок репродуктивного віку із РВВК та 40 здорових жінок репродуктивного віку, які увійшли до контрольної групи (КГ).

Матеріалом для мікробіологічного дослідження слугувало відокремлюване піхви та каналу шийки матки. Мікробіологічна діагностика ґрунтувалася на оцінюванні стану мікроценозу піхви за результатами комплексного дослідження: мікроскопії вагінальних мазків, пофарбованих за Грамом, та культурального дослідження піхового вмісту.

Мікроскопічний метод використовували для оцінювання стану вагінального мікроценозу. Вагінальні мазки після фіксації в етанолі забарвлювали за Грамом і мікроσκοпували з імерсією. Враховували такі показники:

- характер вагінального епітелію – приналежність до поверхневого, проміжного або парабазального шарів, їх кількість у полі зору,
- наявність «ключових клітин» (клітин поверхневих шарів з адгезованими на них у масивній кількості бактеріями, за морфологією подібними до гарднерелл, формами),
- наявність лейкоцитарної реакції (кількість лейкоцитів у полі зору),
- загальну мікробну обсіменіння (мізерне, помірне, велике, масивне),
- морфологічний склад мікрофлори та кількісне співвідношення мікробних морфотипів, зокрема наявність клітин дріжджових грибів, бластоспор або міцелію.

Культуральне дослідження передбачало виділення грибів з патологічного матеріалу, кількісну їх оцінку та видову ідентифікацію у пацієток з РВБК та у здорових жінок (контрольна група).

Статистичний аналіз отриманих даних виконано за допомогою програмного забезпечення «SPSS Statistics». Категоріальні змінні визначено як абсолютне число випадків у групі та відповідна частота у відсотках – n (%). Статистично значущими прийнято відмінності при $p < 0,05$ [29]. Результати графічно відображено за допомогою засобів програмного пакета «Microsoft Office».

Дослідження виконано згідно з принципами Гельсінської декларації, з дотриманням відповідних законодавчих норм і вимог щодо проведення клінічних/біомедичних досліджень. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду жінок.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати мікроскопічного дослідження вагінальних мазків представлені у табл. 1. За даними мікроскопічної діагностики встановлено, що у 52 (72,8%) жінок діагностовано класичний варіант ВВК, коли дріжджові гриби вегетують на тлі нормального мікрофлори, тобто абсолютного домінування лактобактерій. У 18 (25,7%) пацієток виявлено поєднання ВЛК з БВ. У 4 (5,7%) випадках при мікроскопії на тлі вираженої лейкоцитарної реакції виявлені дріжджові клітини, що брунькуються у поєднанні з помірною кількістю грампозитивних коків і невеликою кількістю морфотипу лактобацил (поєднання ВВК з неспецифічним вагінітом (НВ)).

Порівняльний аналіз мікроскопічної картини при РВБК у КГ продемонстрував, що при РВБК загальна кількість мікроорганізмів у 19 (27,2%) пацієток була помірною і становила від 10^1 до 10^2 мікробних клітин у полі зору, у 33 (47,1%) – великою – 10^2 – 10^3 мікробних клітин у полі зору. У пацієток із поєднаною формою ВВК та БВ виявлено масивну мікробну обсімененість піхви, тобто кількість мікроорганізмів перевищувала 10^3 мікробних клітин у полі зору.

Серед епітеліальних клітин переважали поверхневі (100,0% у 70 жінок), у 51 (72,8%) пацієтки поверхневі клітини поєднувалися з проміжними. У 2 (2,8%) пацієток виявлено парабазальні епітеліальні клітини. Фонова мікрофлора у пацієток із класичним кандидозом була однорідною, домінували морфотипи лактобацил, у жінок із поєднаною формою ВВК з БВ переважали морфотипи анаеробів та гарднерелли. При поєднанні з НВ домінували грампозитивні коки.

У більшості пацієток із РВБК переважала помірна та виражена лейкоцитарна реакція, яка спостерігалася у 66 (94,2%) випадків. Водночас у 4 (5,7%) жінок лейкоцити були відсутні або були поодинокі в препараті.

Таблиця 1

Мікроскопічні дослідження в обстежених пацієнтках

Ознаки	ОГ, n=70		КГ, n=40	
	Абс. число	%	Абс. число	%
Епітеліальні клітини:				
Поверхневі	70	100,0	40	100,0
Проміжні	51	72,8*	11	27,5
Парабазальні	2			
«ключові»	18	25,7	-	-
Лейкоцити:				
0 – поодинокі в препараті	4	5,7*	8	20,0
До 10 у п/з	23	32,8	-	-
> 11 у п/з	43	61,4	-	-
Загальна кількість мікроорганізмів:				
Мале – 0–10 у п/з	-	-	-	-
Помірне – від 11 до 10 ² у п/з	-	-	27	67,5
Велике – 10 ² – 10 ³ у п/з	19	27,2*	13	32,5
Масивне – > 10 ³ у п/з	33	47,1	-	-
	18	25,7	-	-
Морфотипи лактобактерій	53	75,7*	70	100,0
Морфотипи облігатних анаеробів (гарднерелли)	18	25,7*	2	5,0
Грампозитивні коки	4	5,7	-	-
Наявність елементів грибів	70	100,0	-	-

Примітка: * $p < 0,05$ – значущість відмінностей між ОГ та КГ.

У пацієнток КГ кількість мікроорганізмів була мала – 27 (67,5%) випадків або помірною 13 (32,5%) випадків. Превалювали лактобацили. Вагінальний епітелій був представлений клітинами поверхневих шарів, в 11 (27,5%) пацієнток у поєднанні з проміжними клітинами. Вміст лейкоцитів у мазку обчислювалося або одиничними у препараті у 32 (80,0%) пацієнток, або не перевищувало 10 у полі зору – у 8 (20,0%) жінок.

Культуральне дослідження було спрямоване на виділення дріжджових грибів, їх видову ідентифікацію, визначення їх чутливості до антимікотиків, а також оцінку вагінальної фонові мікрофлори при РВБК. Проведено видову ідентифікацію всіх штамів дріжджових грибів, виділених у жінок, що спостерігаються. Видовий склад виділених грибів представлений у табл. 2.

Дані табл. 2 демонструють видове різноманіття складу дріжджових грибів. Встановлено, що з вагінального виділення 70 пацієнток із РВБК виділено 70 штамів дріжджових грибів 7 видів. Максимальна кількість виділених грибів (87,1% штамів) належала роду *Candida*. Дріжджові гриби виділяли як і в монокультури, так і в асоціації один з одним. Частота грибкових моноінфекцій становила 61,4% (у 65 пацієнток із 70), а інфекцій, викликаних асоціаціями двох видів грибів – 38,5% (у 43 пацієнток із 70).

Серед збудників моноінфекції найчастіше виділяли *Candida albicans* – 59 (84,2%) випадків, рідше *Candida glabrata* – 5,2%, *Saccharomyces cerevisiae* і *Candida krusei*. Моноінфекти виділяли з частотою менше 10/0.

Таблиця 2

Види дріжджових грибів у пацієнток основної групи

Види дріжджових грибів	ОГ, n=70	
	Абс. число	%
Candida albicans	61	87,1
Candida glabrata	3	4,3
Candida kefir	1	1,4
Candida tropicalis	1	1,4
Candida paraps ilos is	1	1,4
Candida krusei	2	2,8
Candida lusitaniae	1	1,4
Candida albicans+ Geotrichum candidum	4	4,7
Candida albicans+ Rhodotorula mucilaginosa	6	8,6
Candida albicans + Candida glabrata	12	17,1
Candida albicans + Candida parapsilosis	5	7,1
Усього	70	100

У складі асоціацій грибів, виділених у 5 жінок, одним з асоціантів завжди був вид *Candida albicans*, інші були представлені *Candida glabrata* – 8 (11,4%) випадків, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir*, *Candida lusitaniae* – по одному випадку, що становило 4–2,8%. Концентрація грибів коливалася від 10^5 до 10^7 КОЕ/мл.

Етіологічна значущість збудників РВБК представлена у табл. 3.

Оцінювання частки різних видів серед 70 штамів дріжджових грибів, виділених у хворих на РВБК, продемонструвала, що провідне місце посідає вид *Candida*

Таблиця 3

Висівання різних видів дріжджових грибів у пацієнток ОГ

Види дріжджових грибів	ОГ, n=70	
	Абс. число	%
Candida albicans	59	84,2
Candida glabrata	8	11,4
Candida krusei	2	2,8
Saccharomyces cerevisiae	1	1,4
Candida kefir	-	-
Candida lusitaniae	1	1,4
Усього	70	100,0

albicans (84,2%), другу позицію – *Candida glabrata* (11,4%). Питома вага *Candida krusei* становила 2 (2,8%) випадки, *Saccharomyces cerevisiae* та інших видів висівність – по одному випадку (1,4%).

ВИСНОВКИ

При РВВК загальна кількість мікроорганізмів у 19 (27,2%) пацієнток була помірною та становила від 10^1 до 10^2 мікробних клітин у полі зору, у 33 (47,1%) – великою – 10^2 – 10^3 мікробних клітин у полі зору. У пацієнток із поєднаною формою ВВК та БВ виявлено масивну мікробну обсімененість піхви, тобто кількість мікроорганізмів перевищувала 10^3 мікробних клітин у полі зору.

У більшості пацієнток із РВВК переважала помірна та виражена лейкоцитарна реакція, яка спостерігалася у 66 (94,2%) випадків. Водночас у 4 (5,7%) жінок лейкоцити були відсутні або були поодинокі в препараті.

Виявлено, що найчастішим збудником кандидозної інфекції є *C. albicans* (84,2%), який чутливий до сучасних антимікотиків, на другій позиції – *Candida glabrata* (11,4%).

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

Features of vaginal smear microscopy in women with recurrent vulvovaginal candidiasis N. Ya. Ratushniak

The objective: to determine the features of the vaginal microbiota in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVK).

Materials and methods. A prospective study and clinical and laboratory analysis of vaginal microbiocenosis in women with RVVK were conducted. The main group (MG) consisted of 70 women of reproductive age with recurrent vulvovaginal candidiasis and 40 healthy women of reproductive age who made up the control group (CG). The scope of the study - evaluation of the microbiocenosis of the vagina according to the data of the smear microscopy, stained according to Gram, cultural study of vaginal secretions

Results. It was established that 52 (72.8%) women were diagnosed with the classic variant of vulvovaginal candidiasis (VVK), when yeast fungi grow against the background of normal microflora, i.e. absolute dominance of lactobacilli. In 18 (25.7%) patients, a combination of VVK and bacterial vaginosis (BV) was detected. Surface cells predominated among epithelial cells (100.0% in 70 women), in 51 patients (72.8%) surface cells were combined with intermediate cells. Parabasal epithelial cells were found in 2 patients (2.8%). Background microflora in patients with VVK was homogeneous, lactobacilli morphotypes dominated, in women with a combined form of VVK with BV, anaerobes and *Gardnerella* morphotypes prevailed. In patients with RVVK, a moderate and pronounced leukocyte reaction prevailed, which was observed in 66 (94.2%) cases, in 4 (5.7%) women, leukocytes were absent or were single in the preparation.

Conclusions. With RVVK, the total number of microorganisms in 19 (27.2%) patients was moderate and ranged from 10^1 to 10^2 microbial cells in the field of vision, in 33 (47.1%) – large – 10^2 – 10^3 microbial cells in the field of vision. In patients with a combined form of IVC, the number of microorganisms exceeded 10^3 microbial cells in the field of view, moderate and pronounced leukocyte reaction also prevailed, which was observed in 66 (94.2%) cases. The most frequent causative agent of candidal infection is *S. albicans* (84.2%), followed by *Candida glabrata* (11.4%). The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the participating institution. The informed consent of the patient was obtained for conducting the studies.

Keywords: state of vaginal microbiocenosis, vulvovaginal candidiasis, vaginal smear microscopy, microbial cells, candidal infection.

Відомості про автора

Ратушняк Наталія Ярославівна – аспірант, кафедри акушерства, гінекології та репродуктології, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.
E-mail: natali.ratushnjak@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2692-0548

Information about the authors

Ratushniak Natalia Ya. – graduate student, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv. *E-mail: natali.ratushnjak@gmail.com*

ORCID: 0000-0002-2692-0548

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Sherrard, J., Wilson, J., Donders, G., Mendling, W., & Jensen, J. S. (2020). 2020 European (IUSTI/WHO) International Union against sexually transmitted infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO) guideline on the management of vaginal discharge. *International journal of STD & AIDS*, 29(13), 1258-1272.
- Sule-Odu, A. O., Akadri, A. A., Oluwole, A. A., Osinupebi, O. A., Andu, B. A., & Lawal, A. I. (2020). Vaginal Candida infection in pregnancy and its implications for fetal well-being. *African Journal of Reproductive Health*, 24(3), 33-40.
- Ghaddar, N., Anastasiadis, E., Halimeh, R., Ghaddar, A., Dhar, R., AlFouzan, W., ... & El Chaar, M. (2020). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon. *BMC infectious diseases*, 20(1), 1-9.
- Kravchenko, O. V. (2021). Проблемні питання діагностики та лікування вульвовагінітів змішаної бактеріально-кандидозної етіології. *Reproductive Endocrinology*, (57), 43-46.
- Hizkiyahu, R., Baumfeld, Y., Paz Levy, D., Lanxner Battat, T., Interat, M., & Weintraub, A. Y. (2022). Antepartum vaginal *Candida* colonization and the risk for obstetrical tears. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 35(1), 75-79.
- Schuster, H. J., de Jonghe, B. A., Limpens, J., Budding, A. E., & Painter, R. C. (2020). Asymptomatic vaginal *Candida* colonization and adverse pregnancy outcomes including preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 2(3), 100163.
- Xiao, B., Qin, H., Mi, L., & Zhang, D. (2022). Correlation analysis of vaginal microbiome changes and bacterial vaginosis plus vulvovaginal candidiasis mixed vaginitis prognosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 230.
- Zhao, C., Li, Y., Chen, B., Yue, K., Su, Z., Xu, J., ... & Zhang, L. (2023). Mycobiome Study Reveals Different Pathogens of Vulvovaginal Candidiasis Shape Characteristic Vaginal Bacteriome. *Microbiology Spectrum*, e03152-22.
- McKloud, E. (2021). Understanding Recurrent Vulvovaginal Candidiasis as a dynamic biofilm disease of *Candida* and *Lactobacillus* (Doctoral dissertation, University of Glasgow).
- Hösükoğlu, F. G., Ekşi, F., Erinmez, M., & Uğur, M. G. (2022). An Epidemiologic Analysis of Vulvovaginal Candidiasis and Antifungal Susceptibilities. *Infectious Microbes & Diseases*, 4(3), 131-136.
- Pacha-Herrera, D., Vasco, G., Cruz-Betancourt, C., Galarza, J. M., Barrag n, V., & Machado, A. (2020). Vaginal microbiota evaluation and lactobacilli quantification by qPCR in pregnant and non-pregnant women: a pilot study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 303.
- Joseph, R. J., Ser, H. L., Kuai, Y. H., Tan, L. T. H., Arasoo, V. J. T., Letchumanan, V., ... & Lee, L. H. (2021). Finding a balance in the vaginal microbiome: how do we treat and prevent the occurrence of bacterial vaginosis?. *Antibiotics*, 10(6), 719.
- Nsenga, L., & Bongomin, F. (2022). Recurrent *Candida* Vulvovaginitis. *Venereology*, 1(1), 114-123.
- Lin, Y. P., Chen, W. C., Cheng, C. M., & Shen, C. J. (2021). Vaginal pH value for clinical diagnosis and treatment of common vaginitis. *Diagnostics*, 11(11), 1996.
- Donders, G., Sziller, I. O., Paavonen, J., Hay, P., de Seta, F., Bohbot, J. M., ... & Mendling, W. (2022). Management of recurrent vulvovaginal candidosis: Narrative review of the literature and European expert panel opinion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1257.
- Woelber, L., Prieske, K., Mendling, W., Schmalfeldt, B., Tietz, H. J., & Jaeger, A. (2020). Vulvar pruritus—causes, diagnosis and therapeutic approach. *Deutsches Ärzteblatt International*, 117(8), 126.
- Martinez-Garcia, E., Martinez-Martinez, J. C., Martin-Salvador, A., González-García, A., Pérez-Morente, M. Á., Álvarez-Serrano, M. A., & García-García, I. (2023). Epidemiological Profile of Patients with Vulvovaginal Candidiasis from a Sexually Transmitted Infection Clinic in Southern Spain. *Pathogens*, 12(6), 756.

Перинатологія та репродуктологія: від наукових досліджень до практики | **Perinatology and reproductology:** from research to practice

18. Faria-Gonçalves, P., Rolo, J., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2021). Virulence Factors as Promoters of Chronic Vulvovaginal Candidosis: A Review. *Mycopathologia*, 1-19.
19. Wilson, C. (2005). Recurrent vulvovaginitis candidiasis; an overview of traditional and alternative therapies. *Advance for Nurse Practitioners*, 13(5), 24-9.
20. Van Riel, S. J., Lardenoije, C. M., Oudhuis, G. J., & Cremers, N. A. (2021). Treating (Recurrent) Vulvovaginal Candidiasis with Medical-Grade Honey—Concepts and Practical Considerations. *Journal of Fungi*, 7(8), 664.
21. Rosati, D., Bruno, M., Jaeger, M., Ten Oever, J., & Netea, M. G. (2020). Recurrent vulvovaginal candidiasis: an immunological perspective. *Microorganisms*, 8(2), 144.
22. Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Stafylaki, D., Nioti, E., Hamilos, G., & Kasimati, A. (2019). Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from Greek women with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 62(8), 692-697.
23. Faria-Gonçalves, P., Rolo, J., Gaspar, C., Oliveira, A. S., Pestana, P. G., Palmeira-de-Oliveira, R., ... & Palmeira-de-Oliveira, A. (2020). Recurrent vulvovaginal *Candida* spp isolates phenotypically express less virulence traits. *Microbial Pathogenesis*, 148, 104471.
24. Swidsinski, A., Guschin, A., Tang, Q., Dörffel, Y., Verstraelen, H., Tertychnyy, A., ... & Jiang, X. (2019). Vulvovaginal candidiasis: histologic lesions are primarily polymicrobial and invasive and do not contain biofilms. *American journal of obstetrics and gynecology*, 220(1), 91-e1.
25. Pereira, L. C., Correia, A. F., da Silva, Z. D. L., de Resende, C. N., Brandão, F., Almeida, R. M., & de Medeiros Nóbrega, Y. K. (2021). Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI TOF for identifying species in primary infection and recurrence. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40, 1681-1693.
26. Neal, C. M., & Martens, M. G. (2022). Clinical challenges in diagnosis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. *SAGE Open Medicine*, 10, 20503121221115201.
27. Sasani, E., Rafat, Z., Ashrafi, K., Salimi, Y., Zandi, M., Soltani, S., ... & Hashemi, S. J. (2021). Vulvovaginal candidiasis in Iran: A systematic review and meta-analysis on the epidemiology, clinical manifestations, demographic characteristics, risk factors, etiologic agents and laboratory diagnosis. *Microbial pathogenesis*, 154, 104802.
28. Dermendzhiev, T., Pehlivanov, B., Petrova, A., Stanev, S., & Murdjeva, M. (2022). Quantitative system for diagnosis of vulvovaginal candidiasis. *Journal of Medical Mycology*, 32(4), 101302.
29. Mintser AP. (2018). Statisticheskie metody issledovaniya v klinicheskoy meditsine. *Prakticheskaya meditsina*. 3: 41-45. [Минцер АП. (2018). Статистические методы исследования в клинической медицине. *Практическая медицина*. 3: 41-45].