

Ağız Çalkantı Suyunda *Candida* Türlerinin Belirlenmesinde Real-Time PCR Testinin Tanı Değeri

Diagnostic Value of The Real-Time PCR Test for The Identification of *Candida* Species in Oral Rinse Solutions

Petek Çürük*, Ayşe Sultan Karakoyun*, Nevzat Ünal**, Şehnaz Yılmaz***, M. Emre Benlidayı****, Ertan Kara*****, M. Macit İlkit*

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana, Türkiye

** Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Adana Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Adana, Türkiye

*** Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

**** Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

***** Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Adana, Türkiye

Atıf/Cite as: Çürük P, Karakoyun AS, Ünal N, et al. Ağız çalkantı suyunda *Candida* türlerinin belirlenmesinde real-time PCR testinin tanı değeri. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):245-257.

Öz

Amaç: Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dahil olmak üzere birçok mikroorganizma bulunur. Bu denge halinin bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir. Sunulan çalışmada, ağız florasında tıbbi önemi olan *Candida* türlerinin tanımlanması için real-time PCR (RT-PCR) yönteminin tanı değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 200 öğrenci çalışmaya dahil edildi. Katılımcılardan alınan konsantre ağız çalkantı suyu örnekleri steril eküvyonlu çubuk ile CHROMAgar *Candida* (CAC) besiyerine inoküle edildi. İzole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonunda CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: Toplam 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. En sık izole edilen türler, sıklığa göre, *C. albicans* (%36.1), *C. parapsilosis* (%21.3), *C. dubliniensis* (%14.7), *C. lusitaniae* (%9.8), *C. kefyr* (%8.2), *C. lambica* (%3.3) ve %6.6 diğer *Candida* türleri idi. Ağız içi mantar kolonizasyonu kullanılan diş macunu markası ile ilişkili bulundu ($p = 0.02$). Çalışmada izole edilen *Candida* türlerinden *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* dışındaki türler RT-PCR'ı takiben erime sıcaklığı analizi (MCA) ile belirlendi. Ancak, *C. albicans* ve *C. kefyr*, erime sıcaklıklarına (melting temperature, T_m) göre birbirinden ayırt edilemedi.

Sonuç: *Candida* türlerinin geleneksel yöntemler ile belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesi 2-3 gün sürebilmektedir. İzole edilen *Candida* türlerinin RT-PCR analizini takiben MCA ile tanımlanması basit, ucuz ve çabuk bir yöntemdir. Ancak, çalışmada RT-PCR'in *Candida* türlerinin kesin tanısı için (*C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica*) yeterli olmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler: *Candida*, MALDI-TOF MS, real-time PCR

ABSTRACT

Objective: A variety of microorganisms are found in the oral cavities of healthy humans, including yeast fungi. Disruption of the balance among these microorganisms may cause excessive yeast colonization, or oral candidosis. In the present study, we aimed to investigate the diagnostic value of a real-time PCR method for the identification of medically important *Candida* species in the oral flora.

Methods: Two hundred students from Çukurova University Faculty of Dentistry participated in this study. The concentrated oral rinse water samples from the participants were inoculated into CHROMagar *Candida* (CAC) medium with a swab. CAC along with RT-PCR and MALDI-TOF MS were used to identify the *Candida* species.

Results: A total of 68 yeast fungi were isolated from 52 (26%) clinical samples. The most common isolated species were *C. albicans* (36.1%), *C. parapsilosis* (21.3%), *C. dubliniensis* (14.7%), *C. lusitaniae* (9.8%), *C. kefyr* (8.2%), *C. lambica* (3.3%) and other *Candida* species (6.6%). Oral colonisation of yeast fungi was associated with the toothpaste brand ($p=0.02$). The *Candida* species isolated in this study were reliably identified by RT-PCR melting curve analysis (MCA), except *C. albicans*, *C. kefyr* and *C. lambica*. However, this method could not distinguish *C. albicans* and *C. kefyr* based on their peak melting temperatures (T_m).

Conclusion: It may take 2-3 days for *Candida* species to be identified and differentiated from each other using conventional methods. MCA of *Candida* species using RT-PCR, which can be accomplished in a single day, is a simple, inexpensive, and rapid method. However, this study revealed that RT-PCR was not reliable in the identification of *Candida* species (*C. albicans*, *C. kefyr*, and *C. lambica*).

Keywords: *Candida*, MALDI-TOF MS, real-time PCR

Alındığı tarih / Received:
28.03.2023 / 28.March.2023

Kabul tarihi / Accepted:
16.08.2023 / 16.August.2023

Yayın tarihi / Publication date:
08.12.2023 / 08.December.2023

ORCID Kayıtları

P. Çürük 0000-0002-8687-7772
A. S. Karakoyun 0000-0002-2717-6343
N. Ünal 0000-0001-5121-3100
Ş. Yılmaz 0000-0002-6742-5690
M. E. Benlidayı 0000-0002-6102-9136
E. Kara 0000-0003-2486-8683
M. M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ macitilkit@gmail.com

GİRİŞ

Son 20 yılda, *Candida* ve kandidozların bildirilmesinde önemli artış olduğu bilim çevrelerinin dikkatini çekmiştir. Ancak, sadece invazif kandidozlar ile ilgili olmayıp yüzeysel kandidozları (orofarengiyal, vulvo-vajinal, intertrigo, onikomkoz, paroniki, kronik mukokütanoz) da kapsamaktadır. Bu durum, kuşkusuz bağışıklık sistemi baskılanmış popülasyonda (lösemi, lenfoma, HIV/AIDS, steroid kullanımı, diabetes mellitus vb.) artış ile açıklanabilir^(1,2). Bununla birlikte, *Candida*'ların laboratuvar tanısında önemli ilerlemeler kaydedilmiş, polifazik taksonomik araştırmaların yanında yeni besiyerleri geliştirilmiş (kromojenik agarlar), yeni *Candida* türleri tanımlanmış (*Candida auris*) ve yeni moleküler temelli testler (PCR, RFLP, RT-PCR) uygulamaya girmiştir⁽³⁻⁶⁾. Ayrıca, tıbbi mikoloji ve klinik mikoloji alanında farkındalık artmış ve hemen her ülkede referans laboratuvarların kurulmasına yönelik adımlar atılmıştır. Ulusal ve uluslararası ölçekte eğitim faaliyetleri önem kazanmıştır. Halen yeterli düzeyde olmasa da klinisyen-mikrobiyolog iş birliği desteklenmiş ve geliştirilmiştir. Sonuç olarak, mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin farkındalık yaratılmıştır.

Modern tıbbın günümüzdeki tüm imkânlarına karşılık, mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin sorunlar devam etmektedir. Bir mantar enfeksiyonunun başarılı yönetimi çabuk ve güvenilir tanı yanında uygun antifungal tedaviye hemen başlanması ile mümkündür. Global Action for Fungal Infections (GAFFI), 2025 yılı itibari ile mantar hastalıklarının %95'inin tanınmasını ve yine %95'inin tedavi edilebilmesini hedeflemiştir. Klinik ve mikolojik tanı etkenin tür düzeyinde tanımlanması ile geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır. Tür düzeyinde tanı, bölgesel epidemiyolojik özelliklerin belirlenmesinin yanında kişi odaklı tedavide de önemli adımların atılmasını sağlayacaktır. Ancak, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mikolojik tanı sorunu halen devam etmektedir⁽⁷⁾.

Sunulan çalışmada, hem yüzeysel hem de invazif mikoz etkeni *Candida* cinsi maya mantarlarının çabuk ve doğru tanısı için bir algoritma oluşturulması

hedeflenmiştir. Bu amaçla, RT-PCR testinin tür düzeyinde tanıda değeri ve elde edilen bulguların CHROMagar *Candida* (CAC) besiyeri ve matris aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-ToF MS) yöntemleri ile karşılaştırılması ve literatür eşliğinde tartışmaya açılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.10.2013 tarih ve 25/5 sayı) onaylanmıştır.

Çalışma popülasyonu ve klinik örneklerin alınması: Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde eğitim gören ve rastgele seçilen 200 öğrenci çalışmaya dâhil edildi. Katılımcılara 10–15 ml steril distile su verilerek ağızlarını çalkalamaları istendi⁽⁸⁾. Ağız çalkantı suyu örnekleri steril kapaklı 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak en kısa sürede Tıbbi Mikoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Klinik örnekler, 5–6 Haziran 2022 tarihleri arasında toplandı. Çalışmaya katılmayı kabul eden öğrencilere diş fırçalama alışkanlığı, diş macunu markası, diş taşı varlığı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara tüketimi ile geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu varlığını sorgulayan kısa bir anket çalışması yapıldı ve katılımcılardan aydınlatılmış onam belgesi alındı.

Klinik örneklerden maya mantarlarının izolasyonu: Klinik örnekler 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırılarak pelletin üzerine 400 µL steril distile su eklendi⁽⁸⁾. Elde edilen konsantre ağız çalkantı suyu örneklerinden steril eküvyonlu çubuk ile CAC besiyerine seyreltme/tek koloni ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 36°C'de 48–72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri üreme varlığı/yokluğu, koloni morfolojileri ve pigmentasyonu ile çoklu mantar üremesi yönünden değerlendirildi⁽⁹⁾. Mantar üremesi tespit edilen kültürlerden saf koloni elde etmek amacıyla Sabouraud glikoz agar (SGA, Merck, Darmstadt, Almanya)'a pasajları yapıldı ve tüm ileri işlemlerde kullanıldı.

Maya mantarlarının tür düzeyinde identifikasyonu:
(a) CHROMAgar *Candida* (CAC) besiyeri: Üretici firmanın önerilerine göre koloni renk ve morfolojileri doğrultusunda besiyerleri değerlendirildi ve buna göre, yeşil (*Candida albicans*), metalik mavi (*Candida tropicalis*), kuru pembe (*Candida krusei*), lila/kahverengi (*Candida glabrata/Candida kefyr*) ve beyaz (diğer *Candida* türleri) olarak kabul edildi ve tür ön tanıları kaydedildi⁽⁹⁾.

(b) MALDI-TOF MS yöntemi: Maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanmasında referans olarak MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanıldı. Taze kültürlerden tanımlanması yapılacak koloniden 1 µL alınıp 96'lık MALDI kaset kuyusuna konuldu ve oda ısısında kuruması bekledi. Sonrasında üzerine 1 µL %70'lik formik asit ve biyomarkerların tespiti için matris solüsyonu (α -siyano-4-hidroksisünamik asit) eklendi ve tekrar oda ısısında kuruması için bekledi. Kuruyan kaset kuyularındaki örnekler cihaza yerleştirilip analiz işlemine başlandı. Cihaz ölçüm değerleri üreticinin talimatlarına göre; 2.3–3 arası log-skor değeri yüksek doğrulukta tür düzeyinde tanı, 2–2.29 arası skor güvenilir cins ve olası tür düzeyinde tanı, 1.7–1.99 arası olası cins düzeyinde tanı ve 0–1.69 arası skor ise güvenilir olmayan tanı şeklinde değerlendirildi⁽¹⁰⁾.

(c) Real-time PCR: DNA izolasyonu için üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazır DNA izolasyon kitleri (Zymo Research, Irvine, CA, ABD; Katalog No: D6005) kullanıldı. RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verildi.

RT-PCR analizi, Kalıtım Sağlık Moleküler Tanı Laboratuvarında (Teknokent, Sarıçam, Çukurova Üniversitesi) yer alan cihaz ile (Mx3000P Real-time PCR System, Brookprinter PlacePoway, CA, ABD), ITS2 bölgesine özgül UNF1-F ve UNF2-R primer çifti ile yapıldı. RT-PCR için hazır 5xMaster Mix (Solis BioDyne, Teaduspargi, Estonya) solüsyonu kullanıldı. PCR karışımı 20 µL hacim içinde hazırlandı. Konsantrasyonları 10 pmol/µL olan forward ve reverse primerlerden 0.5 µL eklendi. Her örnek için 1 µL (10 ng/µL) genomik DNA kullanıldı⁽⁵⁾.

Tablo 1. RT-PCR ile *Candida* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer kodu	Primer dizisi (5'→3')
UNF1 Forward	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
UNF2 Reverse	5'-TTG ATA TGC TTA AGT TCA GCG G-3'

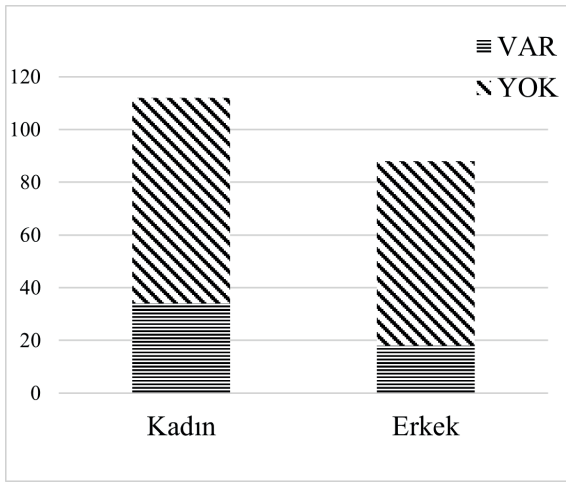
Referans izolatlar: Sunulan çalışmada, *C. krusei* ATCC 6258, *Candida inconspicua* CBS 13938, *C. tropicalis* CBS 13933, *C. albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 90018, *C. glabrata* ATCC 90030 ve *Candida dubliniensis* MI 19941 olmak üzere yedi referans izolat incelendi. Referans izolatlar, CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS ile değerlendirildi.

İstatistiksel analiz: Çalışma verilerinin girilmesi ve analizi için "Statistical Package for the Social Sciences IBM SPSS Statistics 22.0" istatistik programı kullanıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde, sayısal değişkenler ise ortalama ve standart sapma olarak verildi. Çapraz tablolar için, Pearson ki-kare testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık belirlendi. Normal dağılıma uymamalarından dolayı tek değişkenli analizlerde Mann-Whitney U ve Kruskal Wallis testi kullanıldı. Analizler %95 güven aralığında çalışıldı. Tüm analizlerde, $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılmayı kabul eden 200 katılımcının 112'si kadın (%56) ve 88'si erkek (%44) olup yaş ortalaması 23 (yaş aralığı, 19–36) idi. Mantar üremesi belirlenen 52 kişinin 34'ü (%65.4) kadın ve 18'i (%34.6) erkek idi. Katılımcıların cinsiyet ve maya kolonizasyonuna göre dağılımları Şekil 1'de verildi.

Anket Bulguları: Kullanılan diş macunu markası açısından A grubu ticari marka diş macunu kullananlar ile başka ticari marka diş macunu kullananlara göre maya mantarı üreme varlığı ve yokluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu ($p=0.02$). Ağız çalkantı suyunda maya mantarı varlığının diş taşı olanlarda olmayanlara göre 2.28 kat fazla olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 1. Çalışma grubunun cinsiyet ve ağız içi maya mantarı varlığına göre dağılımları.

olmadığı görüldü ($p=0.09$). Ayrıca, ağız içi mantar kolonizasyonu ile diş fırçalama alışkanlığı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara kullanımı ve geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu arasında anlamlı derecede ilişki bulunmadı ($p>0.05$). Anket sonuçları ile mantar kültürlerinde maya mantarı üreme varlığı arasında ilişki Tablo 2'de verildi.

Mikolojik bulgular: Katılımcılardan alınan 200 konsantre ağız çalkantı suyu örneğinde 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. Kültür- pozitif 52 klinik örneğin, 41'inde (%78.8) monofungal ve 11'inde (%21.2) polifungal popülasyon görüldü. Polifungal üremelerin altısında iki farklı maya türü, beşinde ise üç farklı maya türü vardı. Bu 68 maya

Tablo 2. Ağız çalkantı suyunda maya mantarı varlığı ve yokluğunun anket verilerine göre karşılaştırılması

	Üreme var n (%)	Üreme yok n (%)	p değeri
Diş fırçalama alışkanlığı			
Günde bir kez	11 (%21.1)	20 (%13.5)	>0.1
Günde iki kez	37 (%71.2)	112 (%75.7)	
Günde üç kez	4 (%7.7)	16 (%10.8)	
Kullanılan diş macunu markası			
A markası	8 (%15.4)	47 (%31.8)	0.02
Diğer markalar	44 (%84.6)	101 (%68.2)	
Diş taşı varlığı			
Var	17 (%32.7)	31 (%67.3)	0.09
Yok	35 (%20.9)	117 (%79.1)	
Gece plağı kullanımı			
Var	1 (%50.0)	1 (%50.0)	0.45
Yok	51 (%25.8)	147 (%74.2)	
Hareketli dental protez kullanımı			
Var	0 (%0.0)	2 (%100.0)	0.55
Yok	52 (%26.3)	146 (%73.7)	
Sigara tüketimi			
Var	21 (%31.3)	46 (%68.7)	0.24
Yok	31 (%23.3)	102 (%76.7)	
Geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu			
Var	42 (%26.4)	117 (%73.6)	0.79
Yok	10 (%24.4)	31 (%75.6)	

mantarından 61'i (%89.7) *Candida* spp. olup izole edilen türler, sıklığa göre, 22 *C. albicans* (%36.1), 13 *C. parapsilosis* (%21.3), 9 *C. dubliniensis* (%14.7), 6 *C. lusitaniae* (%9.8), 5 *C. kefir* (%8.2), 2 *Candida lambica* (%3.3) ve 4 (%6.6) diğer *Candida* türleri [1 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. inconspicua* ve 1 *Candida pararugosa*] idi. Maya mantarlarının tür dağılımları Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. MALDI-TOF MS ile tanımı doğrulanan maya mantarlarının türlere göre dağılımı

İzolasyon	Pozitif (n)
Monofungal (N=41)	
<i>Candida albicans</i>	17
<i>Candida dubliniensis</i>	6
<i>Candida parapsilosis</i>	8
<i>Candida krusei</i>	-
<i>Candida kefir</i>	3
<i>Candida tropicalis</i>	-
<i>Candida lusitaniae</i>	2
<i>Candida inconspicua</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
Polifungal (N=11)	
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida pararugosa</i>	1
<i>Candida tropicalis</i> + <i>Candida lambica</i> + <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
<i>Candida krusei</i> + <i>Candida lambica</i> + <i>Yarrowia lipolytica</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida kefir</i>	1
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	1
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida kefir</i>	1
<i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida lusitaniae</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Candida albicans</i> + <i>Candida lusitaniae</i> + <i>Candida parapsilosis</i>	2
<i>Candida dubliniensis</i> + <i>Candida parapsilosis</i> + <i>Candida lusitaniae</i>	1
Toplam	52

Ayrıca, CAC besiyerinde 1 *C. tropicalis* kökeni yeşil koloni oluşturdu ve *C. albicans* olarak yanlış identifiye edildi. Bu çalışmada, ağız çalkantı örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin (n=61) CAC ve RT-PCR yöntemi ile tür tanımlamalarının karşılaştırılması MALDI-TOF MS yöntemi referans alınarak yapıldı ve Tablo 4'te sunuldu.

Moleküler bulgular: Referans izolatların RT-PCR analizi ile elde edilen amplifikasyon grafikleri, erime sıcaklığı eğrileri ve erime pikleri Şekil 2a-c'de gösterildi. Klinik izolatlar ve referans suşların aynı zamanda ve tek seferde analizlerine ilişkin veriler ise Şekil 3a-c'de sunuldu.

Monofungal izolatların RT-PCR analizinden elde edilen Tm değerleri Şekil 4'te birlikte değerlendirildi. Polifungal popülasyon belirlenen örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin Tm değerleri ise Tablo 5'te bir arada verildi. Ancak, *C. lambica* olarak identifiye edilen iki izolata polifungal popülasyonda yer almalarına karşılık, RT-PCR ile amplifiye olmamaları sebebiyle Tablo 5'te yer verilmedi.

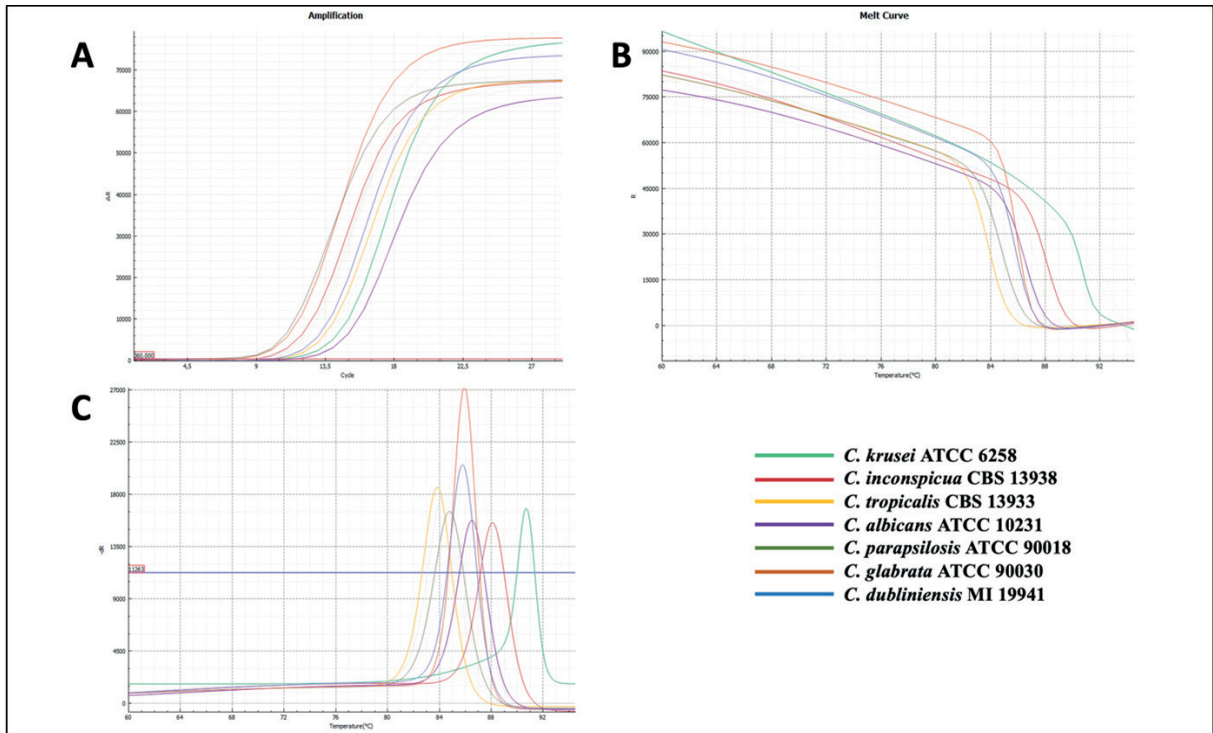
TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, sağlıklı gönüllülerin konsantr e ağız çalkantı örneklerinde maya mantarlarının kolonizasyon oranları %26 (52/200) iken, sırası ile, %20.5'i (41/200) monofungal, %5.5'i ise (11/200) polifungal popülasyon idi. Bu kolonizasyon oranları, literatür verilerine kıyasla (%39–58.6 aralığında) daha düşük bulundu⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Buna karşılık, Yang ve ark.⁽¹⁶⁾ 323 sağlık bölümü öğrencileri ve personelleri ile yaptıkları çalışmada, sonuçlarımıza kıyasla daha düşük (%15.3) oranda maya kolonizasyonu bildirmişlerdir. Katılımcıların Diş Hekimliği Fakültesi öğrencileri olması sebebi ile ağız ve diş temizliği konusundaki hassasiyet ve alışkanlıkları daha düşük izolasyon oranına sebep olmuş olabilir. Aynı zamanda, literatürde ağızda maya kolonizasyonunu belirlemek için ağız çalkantı suyu^(12,13), konsantr e ağız çalkantı suyu⁽¹⁵⁾, tükürük⁽¹¹⁾ ve steril sürüntü çubukları^(14,16) ile örneklerin alındığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Klinik örnek alma yöntemlerinin izolasyon oranlarını etkileyebileceği de bilinmektedir⁽¹⁷⁾.

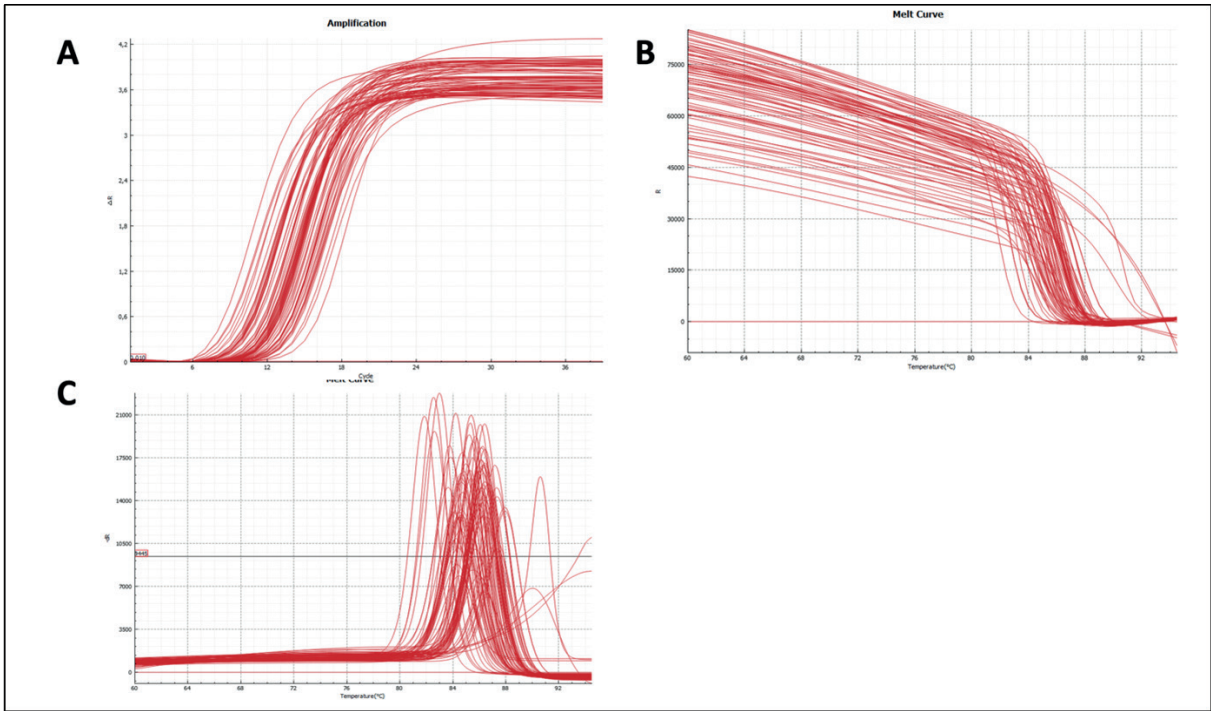
Tablo 4. CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS sonuçlarının karşılaştırılması

Mantar	CAC Pozitif (n)	RT-PCR Pozitif (n)	MALDI-TOF MS Pozitif (n)
<i>Candida albicans</i>	23	22 ^a	22
<i>Candida dubliniensis</i>	9	9	9
<i>Candida krusei</i>	1	1	1
<i>Candida kefir</i>	-	5 ^a	5
<i>Candida tropicalis</i>	-	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	-	13	13
<i>Candida inconspicua</i>	-	1	1
<i>Candida lusitanae</i>	-	6	6
<i>Candida pararugosa</i>	-	1	1
<i>Candida lambica</i>	-	-	2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	-	2
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	2
Diğer mantar türleri (beyaz koloni)	35	9	-
Toplam	68	68	68

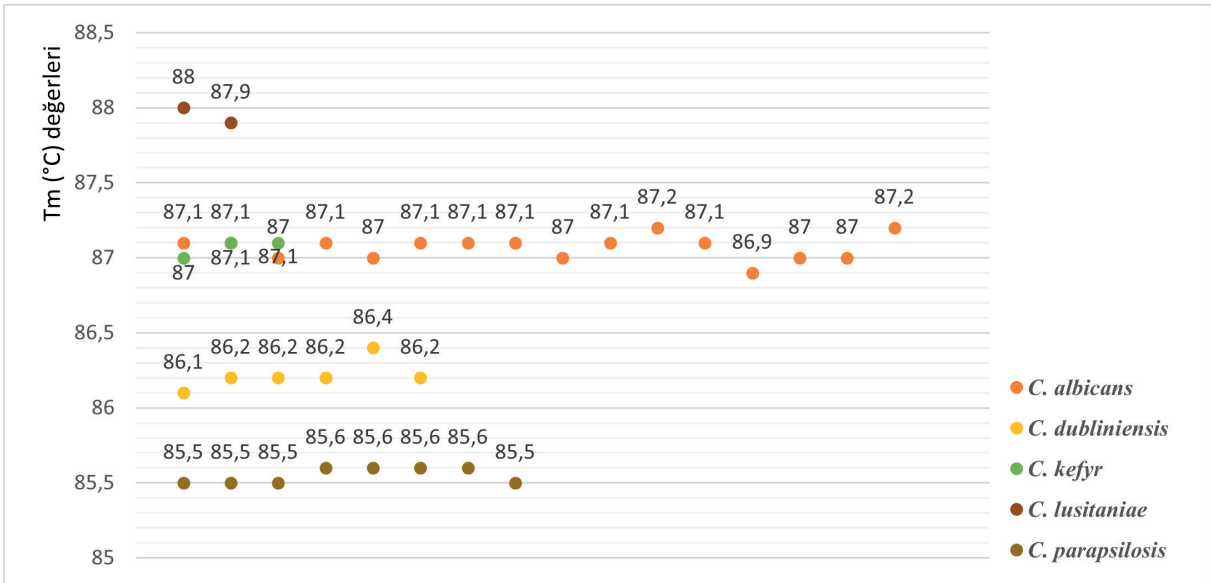
^a*C. albicans* ve *C. kefir* diğer türlerden ayırt edilebildi, ancak T_m (°C) göre birbirlerinden ayırt edilemedi (Bkz. Şekil 4). CAC: CHROMagar Candida.



Şekil 2. Referans izolatların RT-PCR analizi sonucu elde edilen (A) amplifikasyon grafikleri, (B) erime sıcaklığı eğrileri ve (C) erime pikleri.



Şekil 3. Referans ve klinik izolatların RT-PCR analizi sonucu elde edilen (A) amplifikasyon grafikleri, (B) erime sıcaklığı eğrileri ve (C) erime pikleri.



Şekil 4. RT-PCR ile incelenen monofungal klinik izolatların Tm (°C) değerleri.

Ağız florası; sigara kullanımı, diş fırçalama sıklığı gibi hijyen alışkanlıkları ve ağız içi aparat kullanımı gibi birçok değişkenden etkilenmektedir. Özellikle sigara kullanımının ağız içi *Candida* kolonizasyonu üzerine etkileri tartışma konusu olmuştur. Sigara kullanımının ağızda nötrofil aktivitesini ve antimikrobiyal etkinlik

gösteren tükrük miktarını azaltmasının ağız içi *Candida* kolonizasyonunu artırdığı düşünülmektedir⁽¹⁷⁾. Mun ve ark.⁽¹³⁾ sigara içenlerde ağız içi *Candida* kolonizasyonunun içmeyenlere kıyasla yedi kat fazla olduğunu bildirmişlerdir (p=0.034). Ağız içi *Candida* kolonizasyonu ile sigara kullanımı arasında anlamlı

ilişki sunan çalışmalara^(13,14) karşılık, çalışmamıza benzer olarak istatistiksel farklılık görülmeyen çalışmalar da bildirilmiştir^(11,12,15). Ağız içi hijyen alışkanlıkları (diş fırçalama sıklığı, diş macunu seçimi, aparat kullanımı gibi) mikroorganizma yüküne ve virülansına etki ederek ağız sağlığının korunmasına katkı sağlar⁽¹⁷⁾. Çalışmamızda diş fırçalama alışkanlığı, diş taşı varlığı ve gece plağı kullanımı gibi değişkenlerin kolonizasyon üzerine anlamlı bir etkisi belirlenmemesine karşılık, diş macunu seçiminin anlamlı bir fark oluşturduğu görüldü (Tablo 2). Bu durumun sebebi farklı markaların farklı aktif bileşen ve konsantrasyonlara sahip olması olabilir⁽¹⁸⁾.

Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dâhil olmak üzere birçok mikroorganizma denge ve uyum içindedir. Bu denge halinin (i) bağışıklığın baskılanması, (ii) antibiyotik kullanımı ve (iii) farklı beslenme alışkanlıkları gibi durumlarda bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir⁽¹⁷⁾. *C. albicans* ağız boşluğundan ve diğer mukoza yüzeylerinden en sık izole edilen *Candida* türüdür^(17,19). Çalışmamızda izole edilen mantar türlerinden %32.4'ü (22/68) *C. albicans* idi. Benzer çalışmalarda, bizim sonuçlarımıza kıyasla daha yüksek (%48–89 aralığında) *C. albicans* oranları bildirilmiştir⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ 96 sağlıklı gönüllünün konsantre ağız çalkantı suyunda maya kolonizasyonunu inceledikleri çalışmalarında izole edilen maya kolonilerini 28S rRNA sekans analizi ile tanımladıklarında en sık izole edilen

üç türü, sırası ile, *C. albicans* (%52.0), *C. parapsilosis* (%17.9) ve *C. dubliniensis* (%7.5) olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen %13.2 (9/68) *C. dubliniensis* izolasyon oranı ile uyumludur. Ancak, ağızda maya kolonizasyonunu irdeleyen başka çalışmalarda ise *C. dubliniensis* bildirilmemiştir^(11,12,14). Söz konusu çalışmalarda identifikasyon amacıyla yalnızca fenotipik yöntemlerin kullanılması *albicans*-dışı *Candida* türlerinin yanlışlıkla *C. albicans* olarak tanımlanmasına sebep olabileceği düşünüldü.

Klinik örneklerden izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türlerinden biri de *C. parapsilosis* olup özellikle kandidemilerde en sık rastlanan ikinci *Candida* türü olarak bildirilmektedir⁽¹⁹⁻²¹⁾. Özellikle, flukonazol dirençli *C. parapsilosis* ülkemiz için giderek büyüyen bir sorundur⁽²¹⁾. Çalışmamızda, *C. albicans*'ı takiben en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%19.1, 13/68) idi. *C. parapsilosis*'in deride flora üyesi olduğundan sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile (horizontal bulaş) yayıldığı ve hastane enfeksiyonlarına sebep olduğu düşünülmektedir^(21,22).

Çalışmamızda 11 (%5.5) katılımcıda polifungal popülasyon belirlendi. Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ polifungal popülasyon oranını (en çok *C. albicans* + *C. parapsilosis*) %21.8 olarak bildirmişlerdir. Bu oran, benzer bazı çalışmalarda ise %7.1–11.2 olarak sunulmuştur⁽¹¹⁻¹³⁾. Çalışmamızda baskın birliktelik olarak tarif edebileceğimiz bir tür dağılımı dikkati çekmedi, ancak önceki verilere kıyasla polifungal popülasyon oranı daha düşük idi. Ayrıca, *C. albicans*

Tablo 5. Polifungal popülasyondan izole edilen *Candida* türlerinin RT-PCR ile elde edilen Tm (°C) değerleri*

DNA No	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida kefyr</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parugosa</i>
33	87.2		84.8			
107	87.2					84.1
169		86.3			85.6	
175				87.9	85.5	
181		86.2	84.9			
186	87.1			87.8	85.5	
189		86.3		87.9	85.5	
190	87.1			87.9	85.6	

*Toplam 11 polifungal popülasyon belirlenmesine karşılık yalnızca *Candida* türü olan ve amplifiye edilebilen izolatları içermektedir.

ve *C. glabrata*'nın birlikte kolonizasyonunun ağız epiteline invazyonu ve doku hasarını artırdığı bilinmektedir^(17,23). Bununla birlikte, diğer mantar türlerinin bir arada bulunmasının virülans özelliğine katkısı üzerine daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Rivera ve ark.⁽¹⁵⁾ çalışmaları sonucu aynı kişide birden fazla sayıda mantar kolonizasyonunun ağız içi aparat kullanımı ($p = 0.016$) ve kötü ağız hijyeni (O'Leary index, $p=0.012$) ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın sonuçlarımıza benzer olarak Yang ve ark.⁽¹⁶⁾ polifungal popülasyon oranını %6.1 olarak bildirmişlerdir. Bu durumun, seçilen örneklem grubunun ağız ve diş bakımı konusunda görece bilinçli bir popülasyon olması ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Wang ve ark.⁽²⁴⁾ ağız içi kandidozu şüphesi olmayan sağlıklı ve hastanede yatan toplam 1.799 kişiden steril pamuklu çubukla ağız sürüntü örnekleri aldıkları çalışmada katılımcıların 415'inde (%23.1) maya kolonizasyonu rapor etmişlerdir. ITS dizi analizi sonucunda en sık izole edilen türler *C. albicans* (%42), *C. tropicalis* (%20), *C. glabrata* (%5.5) ve *C. parapsilosis* (%4.1) olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda tanımlanan maya türlerinin dağılımına yaş, doğum yeri, ikametgâh yeri ve mevcut sağlık durumu gibi faktörlerin katkıda bulunduğu, ancak cinsiyet ve etnik kökenin etki etmediğini bildirmişlerdir⁽²⁴⁾. Sonuç olarak, izole edilen türlerin dağılımı, çalışma popülasyonlarına ve kullanılan tür tanımlama yöntemlerine göre farklılık gösterebilir.

Sow ve ark.⁽²⁵⁾ 218 maya izolatinin identifikasyonunda geleneksel yöntemler (germ-tüp testi, Mısır unlu-Tween 80 agarda yapısal özelliklerin değerlendirilmesi ve API 20C kiti) ile MALDI-TOF MS yönteminin tür düzeyinde tanımlamalarını karşılaştırmışlardır. Geleneksel yöntemlerle 208 (%95.4) izolatu, MALDI-TOF MS yöntemi ile de 214 (%98.1) izolatu doğru tanımlamışlardır. Ayrıca, geleneksel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlamaya (24–48 saat) kıyasla MALDI-TOF MS yönteminin daha kısa sürede sonuç vermesi (1 saat) ve izolat başına maliyetinin daha ucuz olması vurgulanmıştır. MALDI-TOF MS yönteminin, maya mantarlarının identifikasyonunda %90'ın üzerinde özgüllüğe sahip olduğu bilinmektedir^(25,26). Ancak, *Aspergillus* ve *Mucorales* gibi küf mantarlarının identifikasyonunda bu yöntemin tanı değeri sınırlı olup güvenilir değildir⁽²⁷⁾.

Real-time PCR cihazları amplifiye olan DNA miktarını, işlem sırasında floresan işaretli problarla hibridizasyon sonucu tespit edebildiği gibi DNA molekülüne bağlanan SYBR® Green gibi boyalar ile de yapabilmektedir⁽²⁸⁾. Boya kullanımı problemlardan çok daha ucuz olmasına karşılık, çift zincir DNA molekülüne non-spesifik bağlanması gibi sakıncaları da vardır⁽²⁹⁾. RT-PCR sonrası erime sıcaklığı analizi (MCA) yapılarak bu sorunun üstesinden gelinebilmektedir. Günümüzde RT-PCR için hazırlanmış hidroliz ve hibridizasyon problemleri içeren tanı kitleri *Candida*'ların rutin analizi için kullanılmaktadır⁽³⁰⁾. Tm değeri, PCR sonucu elde edilen çift zincir DNA moleküllerinin yarısının tek zincir DNA moleküllerine dönüştüğü

Tablo 6. Çalışmada referans ve klinik izolatlara ile elde edilen RT-PCR MCA sonuçları ile literatür verilerinin karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri	Bu çalışma Tm (°C)	Somogyvári ve ark. ⁽³²⁾ Tm (°C)	Gutzmer ve ark. ⁽³³⁾ Tm (°C)	Horvath ve ark. ⁽³¹⁾ Tm (°C)
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	91.0	90.8	91.5	89.8
<i>Candida inconspicua</i> CBS 13938	88.8	88.0	-	-
<i>Candida lusitanae</i> [§]	87.2	86.1	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	87.1	87.1	87.5	87.1
<i>Candida kefyr</i> [§]	86.4	-	-	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	85.9	84.9	86.3	-
<i>Candida dubliniensis</i> MI 19941	86.1	85.5	-	85.5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	85.4	85.4	84.9	85.4
<i>Candida tropicalis</i> CBS 13933	84.8	84.5	84.7	84.5

[§]: Klinik izolat

sıcaklık değeridir⁽³¹⁾. MCA yöntemi ile analizini yaptığımız dokuz *Candida* türünün Tm değerlerinin üç farklı grubun verileri ile karşılaştırılması Tablo 6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında MCA'nın tercih edilebilir bir seçim olduğu sonucuna varılabilir⁽³²⁻³⁴⁾. Decat ve arkadaşları ITS2 bölgesine özgü primerler kullanarak 16 *Candida* türünü RT-PCR'dan sonra erime sıcaklığı analizi ile aynı gün içerisinde birbirinden ayırt etmeyi başarmıştır⁽³⁵⁾.

Son yıllarda, High Resolution Melting Analysis (HRMA, yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi) yöntemi Tıbbi Mikrobiyoloji disiplinde sıklıkla kullanılmaktadır⁽³⁶⁾. PCR ile elde edilen ampikondaki G-C miktarı (%) arttıkça erime sıcaklığı (Tm) da yükselmekte olup ampikondaki tek baz değişimi dahi HRMA yöntemi ile belirlenmektedir. Bu yöntemde yüksek konsantrasyonlarda DNA polimerazı (Taq Polymerase) inhibe etme özelliği olmayan, çift zincir DNA molekülüne çok iyi bağlanabilen özel boyalar (LCGreen® ve EvaGreen® gibi) kullanılır. HRMA ile ampikon boyunu da hesaba katan geliştirilmiş yazılım programı ile erime sıcaklığı belirlenir. RT-PCR HRMA özellikle nokta mutasyonlarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle kısa ampikonlarda (50–300 bç) güvenilir sonuçlar alınırken uzun PCR ürünlerinde çoklu erime pikleri elde edilmekte olup kesin tanıyı güçleştirmektedir^(36,37).

Günümüzde bazı araştırmacılar *Candida* türlerinin belirlenmesinde RT-PCR HRMA yöntemini tercih etmektedir^(32,34,38,39). Nemcova ve ark.⁽³⁴⁾ RT-PCR HRMA yöntemi ile bir çift primer kullanarak 25 mantar türünü incelemiş ve bunlardan dokuz *Candida* türü için aldığı sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir. Her *Candida* türünün Tm değerinin bu çalışmada RT-PCR MCA ile bulduğumuz Tm değerlerinden yaklaşık 4°C daha düşük olduğu ve bu durumun yöntem farkından kaynaklanabileceği düşünüldü (Tablo 7). Ancak, Somogyvári ve ark.⁽³²⁾ HRMA yöntemini kullanarak sekiz mantar türü için elde ettiği Tm değerlerinin diğer HRMA sonuçlarından 2°C kadar farklı olduğu açıkça görülmektedir (Tablo 7). Bu farkın kullanılan PCR master miks ve değerlendirmeyi yapan yazılım programından kaynaklandığı düşünülmektedir. HRMA yöntemi ile her *Candida* türünün Tm derecesi MCA yönteminden daha düşük hesaplandığından 90°C üzerindeki Tm değerlerine sahip *Aspergillus* türlerinden kolayca ayırım yapılmasına imkan sağlamıştır^(32,40).

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS ile 10 farklı *Candida* türü belirlendi, ancak *C. lambica* olarak tanımlanan iki klinik izolatin DNA'sı RT-PCR ile amplifiye edilemedi. Nemcova ve ark.⁽³⁴⁾ da aynı primer çifti ile RT-PCR HRMA yöntemiyle *C. lambica*'nın amplifiye olmadığını bildirmiştir. Yazarlar, *C. lambica* referans

Tablo 7. Çalışmada referans ve klinik izolatlar ile belirlenen RT-PCR MCA sonuçları ile literatürde bildirilen HRMA sonuçlarının karşılaştırılması

<i>Candida</i> türleri	Fragment uzunluğu	GC oranı	Somogyvári ve ark. ⁽³²⁾	Nemcova ve ark. ⁽³⁴⁾	Bu çalışma MCA	
			HRMA	HRMA	Tm farkı ⁽³⁴⁾	Tm (°C)
	(b.ç.)	(%)	Tm (°C)	Tm (°C)		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	336	55	88.6	86.6	4.4	91.0
<i>Candida inconspicua</i> CBS 13938	295	52	86.4	84.6	4.2	88.8
<i>Candida lusitanae</i> [§]	244	50	85.4	83.6	3.6	87.2
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	326	47	84.5	82.9	4.2	87.1
<i>Candida kefyr</i> [§]	422	46	–	82.6	3.8	86.4
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	408	46	83.2	81.7	4.2	85.9
<i>Candida dubliniensis</i> MI 19941	331	46	83.5	82.0	4.1	86.1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	300	43	82.6	81.5	3.9	85.4
<i>Candida tropicalis</i> CBS 13933	317	40	81.8	79.4	5.4	84.8

[§]: Klinik izolat; MCA: Erime sıcaklığı analizi; HRMA: Yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizi.

izolatını HRMA ile tanımlamış, ancak üç klinik izolatın amplifiye edilememesini primer bağlanma yöresindeki dizi değişikliğine bağlamıştır⁽³⁴⁾.

Sunulan çalışmada, literatürde de olduğu gibi, HRMA ve MCA yöntemi ile Tm değerlerinin çok yakın olduğu türlerin ayrımı yapılamadı. Şöyle ki; *C. albicans* ve *C. kefyr* aynı Tm derecelerine (°C) sahip olduğu için CAC besiyerinde farklı renkte koloni oluşturmaları sebebi ile tanı konuldu ve bu sonuç MALDI-TOF MS yöntemi ile doğrulandı. HRMA ve MCA, reaktiflerinin ucuzluğu, her RT-PCR cihazına uygunluğu ve kısa sürede sonuç vermesi sebebi ile son yıllarda tercih edilmektedir⁽⁴¹⁾.

Bu çalışmada, klinik örneklerden önce CAC ile hem mantar kültürü yapıldı hem de üç *Candida* türü (*C. albicans*, *C. dubliniensis* ve *C. krusei*) ön tanı düzeyinde belirlendi. Önce, referans izolatlar ile reaksiyon koşulları (PCR) optimize edildi. Sonra, maya kolonilerinden izole edilen DNA ile *C. lambica* hariç tüm izolatların Tm değerleri belirlendi ve tür tayinleri yapıldı. Ayrıca, *C. albicans* ve *C. kefyr*, Tm değerlerine göre ayırt edilemedi. MALDI-TOF MS sonuçları ile karşılaştırıldığında RT-PCR yönteminin *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* tanısı için güvenilir olmayacağı görüldü. Bu sebeple *Candida* cinsi maya mantarlarının laboratuvar tanısında polifazik ayrımın önemi anlaşıldı ve özenle vurgulanmasına ihtiyaç duyuldu.

Etik Kurul Onayı: Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (11.10.2013 tarih ve 25/5 sayılı) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TF2013D3 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This research was conducted with the approval of Cukurova University, Medical Faculty, Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee (10.11.2013; 25/5).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: Cukurova University Scientific Research Coordination Office with project number TF2013D3.

KAYNAKLAR

1. Caceres DH, Mohd Tap R, Alastruey-Izquierdo A, Hagen F. Detection and control of fungal outbreaks. *Mycopathologia*. 2020;185(5):741-5. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00494-1>
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi*. 2017;3:5. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
3. Dendis M, Horváth R, Michálek J, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(12):1191-202. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2003.00719.x>
4. Ayhancı T, Altındış M. Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*. *Türk Hij Den Biyol Derg*. 2020;77(1):123-36. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.26879>
5. Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of *Candida*-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiology Insights*. 2016;9:21-8. <https://doi.org/10.4137/MBI.S38517>
6. Consortium OPATHY, Gabaldón T. Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5):517-47. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz015>
7. GAFFI. Global Fund for Fungal Infections. [<https://gaffi.org>] (Erişim tarihi: 22.Mart.2023).
8. Takagi Y, Fukano H, Shimozaoto K, et al. Genotypes of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J Infect Chemother*. 2013;19(6):1072-9. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0626-5>
9. Ozcan K, Ilkit M, Ates A, Turac-Bicer A, Demirhindi H. Performance of Chromogenic *Candida* agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Med Mycol*. 2010;48(1):29-34. <https://doi.org/10.3109/13693780802713224>
10. Marklein G, Josten M, Klanke U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2912-7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09>

11. Gerós-Mesquita Â, Carvalho-Pereira J, Franco-Duarte R, et al. Oral *Candida albicans* colonization in healthy individuals: prevalence, genotypic diversity, stability along time and transmissibility. *J Oral Microbiol.* 2020;12(1):1820292.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1820292>
12. Genc GE, Ozel S, Erturan Z. Sağlıklı kişilerde oral *Candida* kolonizasyonu sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg.* 2014;28(1):26-31.
<https://doi.org/10.5222/ankem.2014.026>
13. Mun M, Yap T, Alnuaimi AD, Adams GG, McCullough MJ. Oral candidal carriage in asymptomatic patients. *Aust Dent J.* 2016;61(2):190-5.
<https://doi.org/10.1111/adj.12335>
14. Moalic E, Gestalin A, Quino D, Gest PE, Zerili A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. *Caries Res.* 2001;35(2):149-55.
<https://doi.org/10.1159/000047447>
15. Rivera RE, Zuluaga A, Arango K, et al. Characterization of oral yeasts isolated from healthy individuals attended in different Colombian dental clinics. *J Biomed Res.* 2019;33(5):333-42.
<https://doi.org/10.7555/JBR.33.20180067>
16. Yang YL, Leaw SN, Wang AH, Chen HT, Cheng WT, Lo HJ. Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. *Med Mycol.* 2011;49(1):103-6.
<https://doi.org/10.3109/13693786.2010.487076>
17. Patel M. Oral cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the development of infection. *Pathogens.* 2022;11(3):335.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11030335>
18. Yigit N, Aktas E, Ayyildiz A. Antifungal activity of toothpastes against oral *Candida* isolates. *J Mycol Med.* 2008;18(3):141-6.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.06.003>
19. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, et al. *Candida* ve kandidoz: Epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. *Turk Mikrobiyol Cem Derg.* 2015;45(1):1-11.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2015.001>
20. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JC. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606-25.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
21. Arastehfar A, Hilmioğlu-Polat S, Daneshnia F, et al. Clonal candidemia outbreak by *Candida parapsilosis* carrying Y132 F in Turkey: evolution of a persisting challenge. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:676177.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676177>
22. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):e00111-18.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
23. Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW. *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an *in vitro* oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(5):421-7.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x>
24. Wang H, Xu J, Guo H, et al. Patterns of human oral yeast species distribution on Hainan Island in China. *Mycopathologia.* 2013;176(5-6):359-68.
<https://doi.org/10.1007/s11046-013-9703-7>
25. Sow D, Fall B, Ndiaye M, et al. Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. *Mycopathologia.* 2015;180(3-4):173-9.
<https://doi.org/10.1007/s11046-015-9905-2>
26. Pereira LC, Correia AF, da Silva ZDL, et al. Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI-TOF for identifying species in primary infection and recurrence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(8):1681-93.
<https://doi.org/10.1007/s10096-021-04199-1>
27. Li Y, Wang H, Zhao YP, Xu YC, Hsueh PR. Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for identification of *Aspergillus* species directly from growth on solid agar media. *Front Microbiol.* 2017;8:1209.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01209>
28. Arya M, Shergill IS, Williamson M, et al. Basic principles of realtime quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209-19.
<https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
29. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015;439:231-50.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
30. Wang K, Peng H, Wang B. Recent advances in thiol and sulfide reactive probes. *J Cell Biochem.* 2014;115(6):1007-22.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24762>
31. Horváth Á, Pető Z, Urbán E, Vágvolgyi C, Somogyvári F. A novel, multiplex, real-time PCR-based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria. *BMC Microbiol.* 2013;13:300.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-300>
32. Somogyvári F, Horvath A, Serly J, Majoros H, Vagvolgyi C, Peto Z. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo.* 2012;26(6):979-83.

33. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 12):1207-14. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45779-0>
34. Nemcova E, Cernochova M, Ruzicka F, Malisova B, Freiburger T, Nemec P. Rapid identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116940>
35. Decat E, Van Mechelen E, Saerens B, et al. Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Res Microbiol.* 2013;164(2):110-7. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.017>
36. Tong SYC, Giffard PM. Microbiological applications of high resolution melting analysis. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3418-21. <https://doi.org/10.1128/JCM.01709-12>
37. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem.* 2003;49(6 Pt 1):85360. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>
38. Arancia S, Sandini S, De Bernardis F, Fortini D. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;69(3):283-5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.003>
39. Nawar NN, Behiry IK, Yousef RHA, Emara MA. Application of high-resolution melting PCR to detect the genomic fungal ITS 2 region. *Lab Med.* 2020;51(1):66-73. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmz034>
40. Nejad EE, Nejad Almani PG, Mohammadi MA, Salari S. Molecular identification of *Candida* isolates by real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal.* 2020;34(10):e23444. <https://doi.org/10.1002/jcla.23444>
41. Zhang B, Izadjoo M. Differential diagnosis of *Candida* species with real-time polymerase chain reaction and melting temperature analyses (RT-PCR-MTA). *Mil Med.* 2015;180(6):652-9. <https://doi.org/10.7205/MILMED-D-14-00294>