

بررسی رابطه تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس در شیر لثه با شدت بیماری پریدونتال مزمن

دکتر فاطمه رشیدی میبیدی^۱ دکتر نهال کازرونی زاده^۲ دکتر مریم کریمی نسب^۳

۱- استادیار بخش بیماری های دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- دستیار تخصصی گروه ترمیمی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۳- دندانپزشک

خلاصه:

سابقه و هدف: پریدونتیت یک بیماری التهابی در بافت های احاطه کننده ی دندانها، با علت میکروبی می باشد. کاندیدا آلبیکانس یک قارچ دو شکلی می باشد که به طور شایعی در پاکت پریدونتال بیماران یافت می شود. هدف این مطالعه مقایسه میانگین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس در شیر لثه های بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن به تفکیک شدت بیماری بود.

مواد و روش ها: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۸۴ بیمار با سن ۵۵-۲۵ سال انجام شد. ۲۱ نفر از چهار گروه سالم و مبتلا به پریدونتیت خفیف، متوسط و شدید؛ که براساس میزان از دست رفتن چسبندگی تقسیم بندی شدند؛ مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه ها با استفاده از کن کاغذی استریل از شیر لثه های گرفته شد و سانتریفیوژ گردید (۱۰۰۰ دور در دقیقه). سپس در محیط کشت کروم آگار کشت داده شد و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت انکوبه گردید. تعداد کلونی که روی سطوح پلیتھا رشد کرده بود شمارش شد. جهت آنالیز میانگین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس از آزمون آماری Anova استفاده شد.

یافته ها: در گروه سالم فقط در ۶ نفر کلونی رشد کرد در حالی که در تمامی بیماران با پریدونتیت مزمن کاندیدا آلبیکانس در پاکت پریدونتال یافت شد. تفاوت آماری بین گروه سالم، مبتلا به پریدونتیت خفیف، متوسط و شدید مشاهده شد ($P < 0.001$). بیشترین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس در بیماران مبتلا به پریدونتیت شدید یافت شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس با شدت بیماری پریدونتیت مزمن مرتبط می باشد.

واژگان کلیدی: پریدونتیت مزمن، کاندیدا آلبیکانس، مایع شیر لثه ای

وصول مقاله: ۹۴/۸/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۴/۱۰/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۱/۶

مقدمه:

عمق های متفاوت از جمله آن ویژگی ها می باشد. (۷) پاکت های پریدونتال می توانند به آسانی به وسیله بزاق اشباع گردند و در واقع محلی برای قرارگیری و رشد گونه های کاندیدا، به خصوص کاندیدا آلبیکانس شوند. از آنجایی که کاندیدا آلبیکانس به گونه قارچ ها تعلق دارد، تجمع آن ها به صورت بیوفیلم می باشد و تکثیر و رشد آن ها در پاکت های پریدونتال در همان اجتماع بیوفیلمی خود صورت می گیرد. (۸) کاندیدا آلبیکانس بیشتر در لایه های خارجی پلاک و نیز در لایه های عمقی بافت های پریدونتال یافت شده است. (۹) در واقع پاکت های عمیق پریدونتال می توانند در بالانس میکروفلورهای زیر لثه ای تغییر ایجاد نمایند و محلی برای حضور میکروارگانیسم های مخرب بافت پریدونتال شوند (۱۰)

Canabarro و همکاران به ارتباط بین میزان کلونی

پریدونتیت مزمن از شایع ترین انواع پریدونتیت می باشد و یک بیماری چند عاملی می باشد که تحت تاثیر عوامل محیطی و ژنتیکی می باشد. (۱، ۲) عوامل ژنتیکی میزبان بر روی حساسیت فرد نسبت به پریدونتیت نقش دارند و پیشرفت آن تحت تاثیر عوامل متعددی شامل: شرایط اجتماعی، رفتاری و سیستمیک می باشد. (۳، ۴) اما ترکیب میکروبی پاکت پریدونتال نقش اصلی را در پیشرفت بیماری دارد. (۲) این بیماری با گونه های متفاوتی از میکروارگانیسم همراه می باشد؛ انتروباکتريا، سودوموناس، استافیلوکوکوس و کاندیدا از پاکت پریدونتال بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن جدا شده است. (۵، ۶)

بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن دارای علائم و ویژگی های بالینی دهانی خاصی هستند که وجود پاکت های پریدونتال با

بیشتر، تخریب پریودنتال شدید تعریف شد.^(۴) سپس افراد مورد مطالعه به ۴ گروه ۲۱ نفری شامل گروه شاهد، مبتلایان به پریودونتیت خفیف، پریودونتیت متوسط و پریودونتیت شدید تقسیم بندی شدند.

در ابتدا نمونه بیوفیلم زیر لثه‌ای بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن توسط کن کاغذی شماره ۴۵ که به مدت ۲۰ ثانیه در عمیق ترین شیر لثه‌ای قرار داده شد. جمع آوری گردید سپس جهت تعیین تعداد کلونی رشد کرده نمونه‌ها سریعاً دریک سی سی سرم فیزیولوژی قرار داده شد و به لابراتوار منتقل شد و با ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. با استفاده از سمپلر ۵۰ میکرولیتری نمونه به محیط کشت منتقل شد و با استفاده از گلاس بار استریل بر روی محیط کشت پخش شد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل انکوباتور قرار داده شد.^(۷)

میزان رشد قارچی مخمر با شمارش تعداد کلونی رشد کرده درون هر پلیت اندازه گیری شد. در محیط کشت کروم آگار گونه های کاندیدا آلبیکانس تروپیکالیز و کروسی رشد میکنند که با استفاده از رنگ کلونی رشد کرده از یکدیگر قابل تمایز می باشند. به گونه‌ای که کلونی کاندیدا آلبیکانس بر روی محیط کشت کروم آگار کلونی به رنگ سبز، تروپیکالیز به رنگ بنفش و کروسی به رنگ صورتی دیده می‌شود.^(۱۷-۱۳) پس از شمارش تعداد کلونی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

ضریب رقت × ضریب حجم × ۲ × تعداد کلونی = CFU/ml

$10^6 \times 2 \times \text{تعداد کلونی} = \text{CFU/ml}$

نتایج جهت مقایسه تعداد کلونی در ۴ گروه، از آنالیزهای آماری one – way ANOVA و LSD استفاده شد و داده ها توسط نرم افزار آماری spss18 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها:

میانگین سنی در ۴ گروه اختلاف معناداری نداشت ($p=0/19$)

کاندیدا آلبیکانس با شدت بیماری پریودونتیت مزمن اشاره کردند.^(۷) Cuesta و همکاران نیز در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که میزان شیوع مخمر کاندیدا آلبیکانس در پاکت پریودونتال (۷۶/۲ درصد) و بیشتر از شیوع آن در حفره دهان (۶۳ درصد) می‌باشد.^(۱۱) Urzua و همکاران در بررسی عوامل اتیولوژیک پریودونتیت دریافتند که فقط کاندیدا آلبیکانس و *Dubliniensis Candida* به عنوان تنها کلونی موجود در پاکت‌های پریودنتال در بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن حضور دارند ولی فقط کاندیدا آلبیکانس در محل زیر لثه‌ای بیماران سالم و بیماران مبتلا به پریودونتیت مهاجم شناسایی شد.^(۱۲)

با توجه به تناقضات و کمبود اطلاعاتی در این زمینه، این تحقیق با هدف مقایسه میانگین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس در شیر لثه ای بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن به تفکیک شدت بیماری صورت گرفته است.

مواد و روش ها:

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۸۴ نفر شامل ۲۱ نفر فرد سالم و ۶۳ نفر بیمار مبتلا به پریودونتیت مزمن (خفیف، متوسط، شدید) با محدوده سنی ۲۵ تا ۵۵ سال مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اصفهان (خوراسگان) انتخاب شدند. بیماران دارای پلاک ایندکس ۳۰ تا ۵۰ درصد بودند و بیماران با سابقه بیماری سیستمیک، بیماران دچار فقر آهن، بیماران مصرف کننده سیگار و داروی مخدر، زنان باردار، مصرف کنندگان داروهای استروئیدی و آنتی بیوتیک، بیماران دارای دندان مصنوعی کامل یا پارسیل و بیماران با سابقه جراحی پریودنتال از مطالعه خارج شدند.^(۱۱)

پس از انتخاب بیماران و معاینه پریودنتال و تعیین نوع پریودونتیت (خفیف- متوسط- شدید)، از آنها نمونه-گیری به عمل آمد. در واقع اگر بیشتر از ۱ تا ۲ میلی‌متر، از بین رفتن اتصالات اتفاق نیفتاده بود، تخریب از نوع خفیف، اگر ۳ تا ۴ میلیمتر از بین رفتن اتصالات روی داده بود، از نوع متوسط و در صورت وجود از بین رفتن اتصالات، به میزان ۵ میلی‌متر و

و توزیع فراوانی جنس نیز در ۴ گروه تفاوت معناداری نداشت ($p=0/68$) (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه به تفکیک سن

گروه	سن (به سال)	انحراف معیار $\pm$ میانگین	حداقل	حداکثر	آزمون
کنترل		$39 \pm 10/3$	۲۵	۵۵	
پریودونتیت خفیف		$38/8 \pm 8/8$	۲۵	۵۳	$P=0/19$
پریودونتیت متوسط		$41/1 \pm 9/1$	۲۵	۵۵	
پریودونتیت شدید		$44/3 \pm 8/2$	۲۵	۵۵	

جدول ۲. توزیع فراوانی افراد مورد مطالعه به تفکیک جنس

گروه	مرد (درصد) تعداد	زن (درصد) تعداد	جمع	آزمون
کنترل	۹ ($42/9$)	۱۲ ($57/1$)	۲۱	
پریودونتیت خفیف	۱۱ ($52/4$)	۱۰ ($47/6$)	۲۱	$P=0/68$
پریودونتیت متوسط	۱۱ ($52/4$)	۱۰ ($47/6$)	۲۱	
پریودونتیت شدید	۱۳ ($61/9$)	۸ ($38/1$)	۲۱	

شمارش تعداد کلونی در گروههای مختلف نشان داد که در گروه کنترل در ۶ نفر کاندیدا آلبیکانس رشد کرده با حداکثر تعداد کلونی ۶ و میانگین $3/12$ در حالی که در ۳ گروه دیگر در تمامی نمونه ها کاندیدا آلبیکانس یافت شد و به ترتیب بیشترین میانگین تعداد کلونی در گروه شدید $67/14$ ، متوسط $35/67$ و در خفیف $10/57$ گزارش شد.

آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین تعداد کلونی در گروههای مختلف به تفکیک شدت بیماری متفاوت می باشد ($P<0/001$). و آزمون LSD نشان داد که میانگین تعداد کلونی در تمامی گروهها با هم تفاوت معناداری داشت ($P<0/001$) (جدول ۳).

جدول ۳- میزان کلونی کاندیدا آلبیکانس در شیار لثه ای به تفکیک گروه های مورد مطالعه

شدت بیماری	انحراف معیار $\pm$ میانگین	حداقل	حداکثر	آزمون
کنترل	$3/12 \pm 1/9$	۰	۶	
پریودونتیت خفیف	$10/57 \pm 2/6$	۸	۱۶	$P<0/001$
پریودونتیت متوسط	$35/67 \pm 8/1$	۲۰	۴۶	
پریودونتیت شدید	$67/14 \pm 10/5$	۴۸	۸۱	

در مقایسه دو به دوی گروهها بین تعداد کلونی نشان داده شد که تفاوت معناداری بین هر کدام از گروههای سالم، پریودونتیت خفیف، متوسط و شدید وجود داشت و بطور کلی با افزایش شدت بیماری تعداد کلونی افزایش یافت. ($p < 0/001$)

بحث:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وجود بیماری پریودونتیت مزمن باعث تسهیل تشکیل کلونی زیر لثه ای و افزایش شدت بیماری باعث افزایش تعداد کلونی می شود.

آشفستگی در ساختارهای اپی تلبالی در نواحی عمیق ضایعات پیشرفته بیشتر دیده می شود و در نتیجه مخمر به بافتهای پریودونتال زیرین دسترسی پیدا می کند و متابولیت هایی تولید می کند که باعث صدمه ی بیشتر به بافتهای پریودونتال و در نتیجه پیشرفت بیماری می شود. به عنوان مثال کاندیدا آلبیکانس با تولید پروتئاز از ماتریکس خارج سلولی و اجزای غشا پایه باعث این عمل می شود. در حقیقت یک پاکت عمیق باعث تغییر تعادل میکروفلور زیر لثه ای می گردد که یک عامل پیش خطر برای تخریب پریودونتال و در نهایت پیشرفت بیماری پریودونتال می گردد. (۱۱، ۱۸، ۱۹)

Canabarro و همکاران در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که میزان کاندیدا آلبیکانس و دیگر گونه های مخمر در پاکت پریودونتال بیماران با پریودونتیت مزمن شدید از افراد سالم، بیماران با پریودونتیت خفیف و متوسط بیشتر می باشد و ممکن است این میکروارگانیسم ها در تمامی نواحی زیر لثه ای

حضور نداشته باشند بلکه فقط در پیشرفت بیماری پریودونتیت مزمن دخالت داشته باشند.^(۷)

Melton و همکاران شیوع گونه های کاندیدا در نمونه های پلاک زیر لثه ای بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن با دیابت کنترل شده و کنترل نشده را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در هر دو گروه بیماران با دیابت کنترل شده و کنترل نشده شیوع کاندیدا آلبیکانس از گونه های دیگر بیشتر می باشد.^(۱۹) نتایج مطالعه Cuesta و همکاران حاکی از آن است که میزان شیوع استافیلوکوکوس و کاندیدا در پاکت پریودونتال مساوی و برابر ۱۳/۴ درصد است در حالی که میزان شیوع مخمر کاندیدا آلبیکانس در پاکت پریودونتال (۷۶/۲ درصد) بیشتر از شیوع آن در حفره دهان (۶۳ درصد) می باشد.^(۱۱)

به نظر می رسد شیوع بیشتر مخمر کاندیدا در پاکت پریودونتال به علت فراهم آمدن شرایط مساعد محیطی و تغذیه ای در پاکت جهت رشد و تکثیر کاندیدا آلبیکانس می باشد و علاوه بر این گونه ی کاندیدا آلبیکانس به علت داشتن عوامل بیماریزایی بیشتر، فراوان تر از گونه های دیگر کاندیدا یافت می شود.

Urzuu و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که کلونی کاندیدا آلبیکانس در ناحیه ی زیر لثه ای افراد سالم نیز یافت می شود. همانطور که در مطالعه ی حاضر مشاهده شد که در ۲۸ درصد افراد سالم، در بیوفیلم زیر لثه ای کاندیدا حضور دارد.^(۱۲)

Machado و همکاران اثبات کردند که میزان چسبندگی کاندیدا آلبیکانس به سلولهای اپیتلیالی در بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن در مقایسه با افراد سالم بیشتر می باشد بنابراین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس در پاکت پریودونتال بیماران مبتلا به پریودونتیت بیشتر از تعداد آنها در لثه ی افراد سالم می باشد.^(۱۸)

چسبندگی کاندیدا آلبیکانس به سلولهای اپیتلیالی یکی از عوامل مهم بیماری زایی آن می باشد که شرایط محیطی همچون: PH، غلظت آهن، کلسیم، روی و کربن دی اکسید در چسبندگی آن نقش دارند و می توان بیان کرد که احتمالا این عوامل محیطی با ایجاد یک پاکت پریودونتال برای کاندیدا

آلبیکانس فراهم می شود و بنابراین با افزایش عمق پاکت و فراهم شدن شرایط بهتر محیطی، چسبندگی کاندیدا به سلولهای اپیتلیالی و در نتیجه تعداد کلونی افزایش می یابد. نتایج مطالعه Brusca و همکاران ارتباط بین کاندیدا و پریودونتیت را فقط برای گونه پاراپسیلوزیز نشان داده و ارتباطی بین کاندیدا آلبیکانس با پریودونتیت گزارش نکرد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد که علت آن را می توان عدم گسترش این مطالعه برای تمام گونه های کاندیدا دانست^(۲۰)؛ در حالی که Dudko و همکاران نشان دادند که چسبندگی کاندیدا آلبیکانس به سلولهای اپیتلیالی نسبت به پاراپسیلوزیز بیشتر می باشد^(۲۱). Rubio و همکاران نیز نتیجه گرفتند که گونه های کاندیدا به ویژه کاندیدا آلبیکانس با چسبندگی به بافتهای نرم باعث تهاجم بیشتر میکروارگانیسم های دیگر از جمله میکروارگانیسم های بی هوازی می شوند^(۲۲) که همسو با نتایج مطالعه حاضر می باشد.

به نظر میرسد که کاندیدا آلبیکانس با تسهیل تهاجم میکروارگانیسم ها به بافتهای زیرین و گریز میکروارگانیسم های پلاک از سیستم ایمنی، باعث تشدید روند پیشرفت بیماری می شود. همچنین کاندیدا آلبیکانس با لیز سلولهای مونوسیت و مهار سلولهای پلی مورفونوکلئور و در نهایت مهار سیستم ایمنی باعث تسهیل تشکیل کلونی زیر لثه ای می شود.^(۵)

در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، درصد بالایی از کاندیدا آلبیکانس در حفره دهان و به خصوص به صورت بیوفیلم در پاکت های پریودونتال آنها یافت شده است که این امر نشان دهنده نقش آنها در پیشرفت بیماری پریودونتال در این بیماران می باشد.^(۱۱) تناوبی بودن بیماری پریودونتال نشان دهنده برانگیخته شدن پاسخ ایمنی میزبان نسبت به بافتهای خود می باشد. تغییر در پاسخ های ایمنی سلولی و هورمونی، به گونه های مختلف از جمله کاندیدا آلبیکانس اجازه کلونیزه شدن را در ناحیه زیر لثه ای و پاکت پریودونتال می دهد.^{(۱۹)، (۱۱)} Jarvensivu و همکاران، مطالعه ای بر روی تکرر عفونت کاندیدا در بافتهای پریودونتال در بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن و گسترش نفوذ این قارچ به بافتهای لثه ای انجام دادند.

این مطالعه همخوانی دارد. از محدودیت‌های این مطالعه، میتوان به تعداد کم بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن شدید و محدودیت زمانی در انتقال نمونه‌ها از بخش پریدونتولوژی به لابراتوار اشاره کرد.

نتیجه‌گیری:

باتوجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد که میانگین تعداد کلونی کاندیدا آلبیکانس با شدت بیماری پریدونتیت مزمن مرتبط می‌باشد.

پاسخ ایمنی به آنتی‌بادی در گونه‌ی کاندیدیایی در ۴ نمونه از ۲۵ بیمار مبتلا به پریدونتیت مزمن مثبت بود (۱۶٪). در واقع کاندیدا آلبیکانس معمول‌ترین قارچ شناخته شده در گروه بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن می‌باشد که با اطلاعات قبلی به دست آمده از بررسی‌های پیشین همخوانی دارد.^(۲۳) در مطالعه دیگری وجود مخمرها و قارچ‌ها را در ۹۶۷ نمونه برداشت شده از کانال‌های ریشه‌ی دچار پریدونتیت مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که بیشترین گونه‌ی رشد یافته بر روی محیط کشت، کاندیدا آلبیکانس بوده است^(۲۴) که با نتایج

References:

1. de Oliveira LF, Jorge AO, Dos Santos SS. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Braz Oral Res* 2006 ;20 (3):202-6
2. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Carinci F, Testori T, Zuffetti F, et al. IL6 and IL10 are genetic susceptibility factors of periodontal disease . *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9(2): 197–201.
3. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high – risk groups and individuals for periodontitis. *J clin periodontal* 2005 ; 32(6):196-209.
4. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol* 2000 2003; 32:11-23.
5. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeast, enteric rods and pseudomonades in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3(2): 47-52.
6. Slots J, Feik D , Rams TE. Age and sex relationship of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral microbiol Immunol* 1990 ;5(6):305-8.
7. Canabarro A, Valle C , Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeast with severity of chronic periodontitis . *J periodont Res* 2013;48(4):428-32
8. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot cell* 2005 ;4(4):633-8
9. Buduneli N, Kiane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J clin periodontal* 2011;38 (11):85-105
10. Hajishenallis G . *Porphyromonas gingivalis*-host interaction : open war or intelligent guerilla tactics ? *Microbes Infect* 2009;11(6-7) :637-45
11. Cuesta AI, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Nastri ML, Rosa AC. Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontol Latinoam* 2010;23(1):20-6.
12. Urzua B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona S, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis : *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Med Mycol* 2008 ; 46(8): 783-93.
13. Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):3025-7.
14. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):58-61.
15. Nayak S, Kavitha B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B, Dorothy AL. Comparative study of *Candida* by conventional and CHROMagar method in non-denture and denture wearers by oral rinse technique. *Indian J Dent Res* 2012;23(4):490-7.
16. Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. Identification of local clinical *Candida* isolates using CHROMagar *Candida*™ as a primary identification method for various *Candida* species. *Trop Biomed* 2011;28(2):269-74.
17. Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med* 2010;5.
18. Machado AG, Komiyama EY, Santos SS, Jorge AO, Brighenti FL, Koga-Ito CY. In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. *J Appl Oral Sci* 2011;19(4): 384-7.
19. Melton JJ, Redding SW, Kirkpatrick WR, Reasner CA, Ocampo GL, Venkatesh A, et al. Recovery of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species from the oral cavity of subjects with periodontitis who had well-controlled and poorly controlled type 2 diabetes: a pilot study. *Spec Care Dentist* 2010;30(6):230-4.
20. Brusca MI, Rosa A, Albaina O, Moragues MD, Verdugo F, Pontón J. The impact of oral contraceptives on women's periodontal health and the subgingival occurrence of aggressive periodontopathogens and *Candida* species. *J Periodontol* 2010;81(7):1010- 18.
21. Dudko A, Kurnatowska AJ. Occurrence of fungi in oral cavity of patients with periodontitis. *Wiad parazytol* 2007; 53(4): 295-300.
22. Rubio NA, Puia S, Toranzo S, Brusca MI. Fungal invasion of connective tissue in patients with gingival-periodontal disease. *Rev Iberoam Micol* 2015; 32(1):20-4
23. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis* 2004; 10(2) :106-12
24. Waltimo TM, Siren EK , Torkko HL, Oslen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod* 1997; 30(2):96-101