



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
ALBICANS İZOLATLARINDA VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Orçun SAV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK

BURDUR-2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MASTİTİSLİ İNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
ALBICANS İZOLATLARINDA VİRÜLENS FAKTÖRLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Orçun SAV

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0465-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

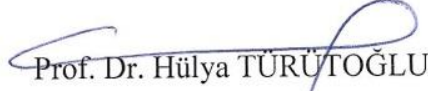
BURDUR-2019

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner Hekim Orçun SAV tarafından *Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK* yönetiminde hazırlanan "*Mastitisli İneklerden İzole Edilen Candida albicans İzolatlarında Virülens Faktörlerinin Belirlenmesi*" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 24/04/2019


Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner
Fakültesi
Başkan


Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK

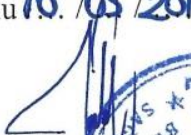
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri


Doç. Dr. Esra ŞEKER

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu 10.05.2019 Tarih ve ...17... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. M. Doga
TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmaları süresince bana her konuda destek veren, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen danışman hocam Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK'e, eğitimim ve çalışmalarım süresince katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU olmak üzere, Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU, Dr. Öğretim Üyesi Özlem Şahan YAPICIER, Araş. Gör. Ezgi ŞABABOĞLU'na, Uzm. Vet. Hek. Sibel Yaman'a, İntörn Vet. Hek. Şefika Akgün'e, tüm aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.



ETİK BEYAN

“Mastitisli İneklerden İzole Edilen *Candida albicans* İzolatlarında Virülens Faktörlerinin Belirlenmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Dilek ÖZTÜRK danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Orçun SAV

Tarih: 24.04.2019

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mantarların Genel Özellikleri	4
2.1.1. <i>Candida</i> 'ların Sınıflandırılması	5
2.1.2. <i>Candida</i> 'ların Morfolojisi	8
2.2. <i>Candida</i> 'ların Patogenezi ve Virülens Faktörleri	8
2.2.1. Adhezyon	9
2.2.2. Dimorfizm	11
2.2.3. Enzimler	12
2.2.4. Biyofilm	14
2.2.5. Fenotipik Değişim	15
2.2.6. Hücre Duvarı	16
2.2.7. Toksinler	16
2.3. <i>Candida</i> Enfeksiyonları	17
2.4. <i>Candida</i> 'ların İzolasyon ve İdentifikasyonu	19
2.4.1. Direk Mikroskopik İnceleme	19
2.4.2. Kültür	20
2.4.3. Germ Tüp Testi	22
2.4.4. Klamidospor Oluşturma	23
2.4.5. Biyokimyasal Testler	23
2.4.5.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	23
2.4.5.2. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri	25
2.4.5.3. Üreaz Testi	25
2.4.5.4. Ticari Teşhis Yöntemleri	26
2.4.5.5. Serolojik Testler	26
2.4.5.6. Moleküler Tanı Yöntemleri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç	28
3.1.1. Maya Suşları	29
3.1.2. Süt Örnekleri	29
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	31
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	33
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Tampon Solüsyonlar	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Süt Örneklerinin Toplanması	37

3.2.2. <i>Candida albicans</i> İzolatlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu	37
3.2.2.1. Germ Tüp Testi	38
3.2.2.2. Klamidosor Oluşumu	38
3.2.2.3. Kromojenik Besiyerinde Üreme	39
3.2.2.4. 45°C'de Üreme	39
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	39
3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu	39
3.2.3.2. <i>C. albicans</i> 'ın PZR ile Doğrulanması	40
3.2.3.3. <i>C. albicans</i> 'ın Virülens Genlerinin Saptanması	40
3.2.4. Biyofilm Oluşumu	41
4. BULGULAR	42
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	42
4.2. PZR Bulguları	44
4.3. Biyofilm Bulguları	46
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57
EKLER	72
Ek-1: Anket Formu	72
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER

Şekil 4.1.	<i>C. albicans</i> izolatlarında germ tüpü oluşumu	42
Şekil 4.2.	Tween 80'li mısır unu besiyerinde <i>Candida</i> izolatlarının görüntüsü	43
Şekil 4.3.	Klamidosporların mikroskopta görünümü	43
Şekil 4.4.	Kromojenik besiyerinde <i>Candida</i> kolonileri	44
Şekil 4.5.	<i>C. albicans</i> izolatlarında CALB1 gen varlığı	45
Şekil 4.6.	<i>C. albicans</i> izolatlarında ALS1 gen varlığı	45
Şekil 4.7.	<i>C. albicans</i> izolatlarında PLB1 gen varlığı	46
Şekil 4.8.	<i>C. albicans</i> izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin tüpte gösterilmesi	47



TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Blastomyces ve Endomyces sınıfları içinde yer alan önemli mayaların sınıflandırılması	7
Tablo 2.2.	<i>C. albicans</i> 'ın karbonhidrat asimilasyon profili	24
Tablo 3.1.	Süt örneklerinin alındığı işletmeler ve örnek sayıları	30
Tablo 3.2.	<i>C. albicans</i> ve virülens faktörlerini kodlayan genler, primer dizisi ve PZR ürünleri	36
Tablo 4.1.	<i>C. albicans</i> izolatlarında PZR ile CALB1, PLB1 ve ALS1 gen varlığının tespit edilmesi	46
Tablo 4.2.	<i>C. albicans</i> izolatlarında virülens faktörleri	47

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikrometre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ALS	Aglütinin benzeri sekans
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
dev	Devir
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EIA	Enzim immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gram
HIV	Human immunodeficiency virüs
HWP	Hifa duvar proteini
ID	Immundefüzyon
ITS	Internal transcriber spacer
IU	İnternasyonal ünite
KF	Komplement fikzasyon
KOH	Potasyum hidroksit
LA	Lateks aglütinasyon
lt	Litre
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry
mcg	Mikrogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesenger ribonükleik asit
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
Op	Opak faz
PAS	Periyodik asit-schiff
PBS	Fosfat buffer solüsyonu
PDA	Patates dekstroz agar
PDB	Patates dekstroz buyyon
pH	Potansiyel hidrojen
PL	Fosfolipaz
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAI	Radioimmunoassay
RCF	Rölatif santrifüj kuvveti

rDNA	Ribozomal deoksiribonükleik asit
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SAP	Salgısal aspartik proteinaz
SDA	Sabouraud dekstroz agar
SDB	Sabouraud dekstroz buyyon
TSB	Triptik soya buyyon
UK	Birleşik Krallık
UV	Ultraviyole
vb	Ve benzeri
vs	Vesaire
YBDA	Yeast patato dekstroz agar
YBDB	Yeast patato dekstroz buyyon
YNB	Yeast nitrogen base
β	Beta



ÖZET

Mastitisli İneklerden İzole Edilen *Candida albicans* İzolatlarında Virülens Faktörlerinin Belirlenmesi

Son yıllarda sığır mastitisinin etiyolojisinde mayaların önemi giderek artmaktadır. Bu çalışmada mastitisli ineklerden toplanan süt örneklerinde *Candida albicans*'ın neden olduğu mastitis prevalansının belirlenmesi, *C. albicans*'ın fenotipik ve genotipik yöntemlerle identifikasyonu ve virülens faktörlerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla anket sonuçlarına göre mastitis problemi bulunan 20 süt sığırları işletmesinden 178 hayvandan 686 süt örneği toplandı. Bu örneklerden 49 maya izolatu elde edildi. Fenotipik testlerle (germ tüp testi, klamidospore oluşumu, kromojenik besiyerinde ve 45°C'de üreme) 5 izolat *Candida albicans* olarak identifiye edildi. Fenotipik testlerle *C. albicans* olduğu saptanan 5 izolat, *C. albicans* CALB1 genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR ile doğrulandı. *C. albicans* izolatlarında adhezyondan (*ALS1*) ve fosfalipaz (*PLB1*) üretiminden sorumlu virülens genleri araştırıldı. İzolatların 2 (%40)'sinde *ALS1* ve *PLB1*, 1 (%20)'inde *ALS1* ve 1 (%20)'inde *PLB1* genleri saptanırken, 1(%20) izolatta her iki genin de bulunmadığı belirlendi. *C. albicans* izolatlarının tüp adherens yöntemiyle biyofilm oluşturma özellikleri incelendiğinde 3 (%60) izolatin güçlü pozitif, 1 (%20) izolatin zayıf pozitif ve 1 (%20) izolatin ise negatif olduğu belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışma ile mastitisli ineklerden izole edilen *C. albicans* izolatlarında önemli virülens genleri olan *ALS1* ve *PLB1* genleri ve biyofilm oluşumu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, *Candida albicans*, Mastitis, Virülens genleri

Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0465-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Determination of Virulence Factors in *Candida albicans* isolated from cattle with mastitis

In recent years, the importance of yeast in the etiology of bovine mastitis is increasing. The aim of this study was to determine the prevalence of *Candida albicans* in milk samples collected from cows with mastitis, to identify the phenotypic and genotypic methods and to determine the virulence factors. According to the results of the surveys, 686 milk samples were collected from 178 animals with mastitis problems from 20 dairy cattle farms. Forty nine yeast isolates were obtained from these samples. Five isolates were identified as *C. albicans* with phenotypic tests (germ tube test, chlamydo spor formation, chromogenic medium and reproduction at 45°C). Five isolates that were found to be phenotypically *C. albicans* were confirmed by PCR using specific primers for the *C. albicans* CALB1 gene. It was determined that 2 (%40) of the *C. albicans* isolates had *ALS1* and *PLB1*, 1 (%20) had *ALS1* and 1 (%20) had *PLB1* genes and no gene were not found in 1 (%20) isolate. When the biofilm formation properties of *C. albicans* isolates were examined by tube adherence method, it was determined that 3 (%60) isolates were strong, 1 (%20) isolate was weak positive and 1 (%20) isolate was negative. In conclusion, in the *C. albicans* isolates which were isolated from cows with mastitis had *ALS1* and *PLB1* genes and biofilm formation.

Keywords: Biofilm, *Candida albicans*, Mastitis, Virulence genes

This research was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordination Unit with 0465-YL-17 project number.

1. GİRİŞ

Candida'lar insan ve hayvanlarda deri, gastrointestinal, üst solunum ve genitoüriner sistemin normal flora üyeleridir. Daha önceleri saprofit olduğu düşünülen *Candida*'ların günümüzde ciddi enfeksiyonlara yol açtıkları ve fırsatçı mikroorganizmalar olarak tanımlandıkları bildirilmiştir (Foley ve Schlafer, 1987; Mousa ve ark., 2016; Seyedmousavi ve ark., 2015; Songer ve Post, 2005). *Candida* cinsinin 200'den fazla türü bildirilmiş olup, bilinen en patojen tür *Candida albicans*'tır (Quinn ve ark., 2011). Hastalıklardan izole edilen diğer önemli türler ise *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii* ve *Candida famata*'dır (Miceli ve ark., 2011).

Son yıllarda insan ve hayvanların maya enfeksiyonlarında artış gözlenmektedir. Maya enfeksiyonlarının oluşmasında mikroorganizmaların virülensi, hayvan ve insanların immun sisteminin payı bulunmaktadır. Human Immunodeficiency Virus (HIV) (Sweet ve ark., 1995) gibi immun sistemi baskılayan enfeksiyonlar, transplantasyon cerrahisi (Shoham ve Marr, 2012), kanser tedavisi (Ramla ve ark., 2015; Teoh ve Pavelka, 2016), medikal aletlerin (katater ve intraket gibi) (Kojic ve Darouiche, 2004) sıklıkla kullanılması, yaygın kortikosteroid ve antibiyotik uygulamaları toplumda immun sistemi baskılanmış kişilerin, dolayısıyla da maya enfeksiyonları için risk grubunun artmasına yol açmaktadır (Pincus ve ark., 2007).

Candida türleri ruminantlarda abortus, artritis, mastitis ve pnömoni (Cohen ve ark., 2008; Dworecka-Kaszak ve ark., 2012; Mousa ve ark., 2016; Stefanetti ve ark., 2014; Şeker, 2010; Şeker ve Özenç, 2011), kedi ve köpeklerde dermatitis, enteritis, otitis eksterna, ve iç organ enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Ali ve ark., 2015; Duchaussoy ve ark., 2015; Milner ve ark., 1997; Moretti ve ark., 2004; Şahan-Yapıcıer ve ark., 2018). *C. albicans* kanatlılarda da pamukçuk, pseudomembranöz ülser ve beyaz plak şeklinde lezyonlara yol açabilmektedir (Hörmansdorfer ve Bauer, 2000; Velasco, 2000).

Mikotik mastitis sığırlarda bakteriyel enfeksiyonlara kıyasla daha az görülmekle beraber, bu vakalardan genellikle *Candida* türleri izole edilmekte ve *C. albicans*'ın en sık izole edilen tür olduğu bildirilmektedir (Costa ve ark., 1993; Eldesouky ve ark., 2016; Pachauri ve ark., 2013). Kontamine sütlerin makina veya elle sağılması, hayvan sahipleri ve veteriner hekimlerin gelişigüzel ve sık antibiyotik kullanımı, kontamine antibiyotik, kanül ve enjektörlerin meme içi uygulanması maya enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Dworecka-Kaszak ve ark., 2012). *C. albicans* pastörizasyon ısısına karşı direnç gösterebildiği için halk sağlığı bakımından da önem arz etmektedir (Schmitt, 1971; Tarfarosh ve Purohit, 2008).

C. albicans dimorfik bir mantar olduğu için maya ve hifa formu arasında geri dönüşümlü geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir. Bu iki formun oluşumuna enfeksiyon bölgesinde rastlanmaktadır (Matthews ve Burnie, 1998). *C. albicans* patogenezi katkıda bulunan birçok virülens faktöre sahiptir. Adhezyon, morfogenezis, aspartil proteaz ve fosfolipaz enzimleri en önemlileridir (Calderone ve Fonzi, 2001).

C. albicans'ın konak hücrede kolonizasyonu ve enfeksiyonu için ilk basamak adhezyondur ve hücre yüzey glikoproteinlerini kodlayan *ALS* (aglutinin benzeri sekans) genlerinin ekspresyonu ile ilişkilidir (Abacı ve Haliki, 2004). *ALS* proteinleri arasında yapısal ortaklık olmasına rağmen işlevleri açısından farklılıklar vardır. *ALS1*, *ALS3* ve *ALS5* mantarların hifal formunda bulunup, konak dokusundaki laminin, fibronektin, kolajen, epitelyum ve endotellere bağlanmada rol alır. *ALS6* kollajene, *ALS9* laminine ve *ALS4* endotellere bağlanmada rol oynarken, *ALS5* hücre agregasyonunda rol oynar (Karkowska-Kuleta ve ark., 2009; Khan ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda *ALS1* geninin enfeksiyonun erken safhalarında *C. albicans*'ın adezyonunda önemli rol oynadığı (Kamai ve ark., 2002) ve *ALS1* ve *ALS3* genlerinin biyofilm formasyonunda birlikte daha fazla etkili oldukları bildirilmiştir (Nobile ve Jhonson, 2015).

C. albicans birçok enzim salgılamasına karşın, patojenitede rol oynayan en önemli enzimlerin proteinaz (salgisal aspartik proteinaz, *SAP*) ve fosfolipazlar (*PL*) olduğu belirtilmiştir (Calderone ve Fonzi, 2001; Mukherjee ve Chandra, 2004). *C.*

albicans proteinazları *C. albicans*'ın penetrasyon, invazyon ve konak immün sisteminden kaçışı için gereklidir (Staib ve ark., 2000; Wibawa, 2016). *SAP* doku invazyonu boyunca kollajen, keratin, müsin, antikor, komplement ve sitokinler gibi yapısal ve immünolojik savunmayla ilgili proteinleri parçaladığından *C. albicans* için önemli bir virülens faktörüdür (Coutinho, 2009; Wibawa, 2016). Mayaların tümü proteinaz enzimi salgılamalarına karşın, fosfolipazın varlığı sadece *C. albicans* izolatlarında bildirilmiştir (Coutinho, 2009). Fosfolipazlar membran lipidlerini hidrolize ederek, hücre membranına zarar verirler. Şimdiye kadar 4 adet fosfolipaz enzimi (*PLA*, *PLB*, *PLC*, *PLD*) saptanmış, hayvan kandidiazis vakalarında sadece *PLB1*'in virülens için gerekli olduğu bildirilmiştir (Navarro-García ve ark., 2001).

Biyofilm, mikroorganizmaların ürettikleri polisakkarit matriks tabaka içinde gömülü olarak yaşayabilen, canlı ve cansız yapılara yapışarak oluşturduğu topluluktur (Abacı ve Haliki, 2004). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar antibiyotiklere, antifungallere, dezenfektanlara ve konakçı immün sistemine direnç gösterirler (Mukherjee ve Chandra 2004; Pincus ve ark., 2007). *Candida* türleri biyofilm kaynaklı mantar enfeksiyonlarında en sık izole edilen mikroorganizmalardır (Kojic ve Darouiche, 2004).

Bu tez çalışmasında, mastitisli inek sütlerinden izole edilen *C. albicans*'ın; adhezyon faktörlerinden *ALS1*, fosfolipaz enzimlerinden *PLB1* ve biyofilm gibi virülens faktörlerini, konvansiyonel ve moleküler teknikler kullanılarak belirlemek amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar ökaryotik mikroorganizmalar olup, klorofilsiz, absorpsiyonla beslenen, yuvarlak veya oval şekilde, genellikle tomurcuklar oluşturarak üreyen, hücre duvarında kitin ve selüloz bulunan, tek hücreli veya çok hücreli mikroskopik canlılardır. Mantarlar maya veya küf olmak üzere iki farklı morfolojik yapıya sahiptir (Koneman ve ark., 1997; Quinn ve ark., 1999). Mayalar tomurcuklar oluşturarak üreyen tek hücreli mikroskopik mantarlardır (Quinn ve ark., 1999). Dokuları invaze etme yeteneğine sahip mayalar Sabourraud Dekstroz agar (SDA)'da aerobik olarak ürerler ve büyük bakteri kolonilerine benzer şekilde yumuşak, kremi koloniler oluştururlar (Quinn ve ark., 2011). Küfler ise hifa adı verilen uzun filamentler oluşturan ve apikal uzamayla büyüyen mantarlardır (Arda, 2015). Medikal olarak önemli mantarların çoğu üremenin saprofitik ve parazitik oluşuna göre iki farklı şekilde görülürler. Bu tür mantarlara dimorfik mantarlar denir. Bu mantarlar oda ısısında üretildiklerinde miselyal, 37°C'de üretildiklerinde veya canlı vücudunda maya benzeri koloniler oluştururlar (Arda, 2015). Dış faktörlerin çoğu dimorfizmi etkilemekle birlikte, en önemlisi inkübasyon ısısıdır. Artmış karbondioksit miktarı *Coccidioides immitis* ve *Sporotrichum schenckii*'nin miselyal formdan maya formuna dönmesini hızlandırır. Bazı mantarlarda da ortam pH'sı maya formuna dönüşü etkiler (McGinnis ve Tying, 1996). *Blastomyces dermatitis*, *C. immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* dimorfik mantarlara örnek verilebilir. Mantarlar süperfisiyal, kutan, subkutan veya sistemik hastalıklara neden olurlar (Madhavan ve ark., 2011; McGinnis ve Tying, 1996). Süperfisiyal mikozis sadece deri, tırnak, saç ve mukoz membranların yüzeysel enfeksiyonlarıdır. *Candida* spp., *Malassezia* spp., *Exophiala* spp., *Trichosporon* spp. ve *Piedraia* spp. gibi dermatofitler süperfisiyal mikozislere neden olurlar (Madhavan ve ark., 2011). Kutan mikozisler, epidermin keratinositleri ile saç ve tırnak gibi yapıların enfeksiyonudur. *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* cinslerini içine alan dermatofitler en yaygın nedenleridir. Subkutan mikozisler ise deri, derialtı dokular ve kemiklerde meydana gelir ve saprofitik mantarlar tarafından oluşturulurlar (Madhavan ve ark., 2011). Mikozislerin bu kategorilerine ek olarak

fırsatçı mikozisler, son yıllarda immün sistemi baskılanmış hastalar arasında dikkat çekmektedir (Madhavan ve ark., 2011). Antibiyotik tedavileri, immünyüpresif ilaçlar, immün sistemi baskılayan hastalık ve tümöral hastalıklar, immün sistemi baskılanmış insanların artmasına ve sistemik mikozisin bu yeni kategorisine yol açmaktadır. *C. albicans* fırsatçı mikozislerin en yaygın sebeplerinden biridir (Madhavan ve ark., 2011; Pincus ve ark., 2007). Mayalar çevrede sıklıkla bitki veya bitki materyallerinde bulunurlar. Aynı zamanda insan ve hayvanların deri ve mukoz membranlarında kommensal olarak yer alırlar. Mayalar çevreden izole edildiklerinde eksojen, kommensal mayaların aşırı üremesi sonucu endojen kaynaklı fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar (Quinn ve ark., 1999). İmmünyüpresyona neden olan faktörler ve uzun süreli antibiyotik kullanımına bağlı olarak flora ve mukozal yüzeyde bulunan bakterilerin ölmesi ve mayaların aşırı çoğalarak dokulara invazyonu maya enfeksiyonlarına yol açar (Quinn ve ark., 1999). Hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan önemli mayalar *Candida* türleri (özellikle *C. albicans*), *Cryptococcus neoformans* ve *Malassezia pachydermatis*'dir. *Trichosporon beigeli* ve *Geotrichum candidum* gibi mayalar ise nadiren enfeksiyonlara yol açar (Quinn ve ark., 1999).

2.1.1. *Candida*'ların Sınıflandırılması

Mantarlar klorofil içermeyen, spor oluşturan, hücre duvarı ve filamentöz yapıya sahip ökaryotik mikroorganizmalardır. Alexopoulos tarafından 1979'da yapılan sınıflandırmada, doğadaki tüm mantarlar Mycetea aleminde yer almışlardır. Buna göre Mycota divizyonu, Myxomycota (hücre duvarı olmayan mantarlar) ve Eumycota (hücre duvarı bulunan mantarlar) olmak üzere 2 alt divizyona ve Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina ve Deuteromycotina (Deuteromycetes, fungi imperfecti) olmak üzere 5 sınıfa ayrılmaktadır (Arda, 2015). Mayalar ilk olarak Fungi Imperfecti içinde yer almışlardır. Veteriner hekimlikte önemli cinsler teleomorflarının gösterilmesi ve sekans analizleri temeline dayanarak, *Ascomycota* (*Candida*, *Macrorhabdus* ve *Geotrichum*) veya *Basidiomycota* (*Cryptococcus*, *Malassezia* ve *Trichosporon*) filumunun içine yerleştirilmiştir (Quinn ve ark., 2011). Mayalar tek bir taksonomik ve filogenetik grup oluşturmazlar. Gerçek mayalar *Ascomycota* filumu içinde *Endomycetes* sınıfı *Saccharomyceteles* takımında yer alır (Howard, 2003). *Candida*

cinsi anamorfik mayaları içerir ve bu cinste ascomycetes veya basidiomycetes ile ilişkili yaklaşık 200 tür bulunmaktadır (Quinn ve ark., 2011). *Candida* cinsi *Deuteromycota* filumunda, *Blastomycetes* sınıfında, *Cryptococcales* takımında ve *Cryptococcaceae* ailesinde yer alır (Howard, 2003; Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999). *Blastomycetes* ve *Endomycetes* sınıfları içinde yer alan önemli mayaların sınıflandırması tablo 2.1’de gösterilmiştir. Mayaların tanımlanması önceleri koloni görünümü ve mikroskopik yapılarına göre yapılırken, günümüzde biyokimya ve moleküler biyoloji araştırmaları taksonomide değişikliklere neden olmakta ve maya taksonomisi sürekli revize edilmektedir (Howard, 2003). Literatürde öne çıkan *Candida* türlerinden bazıları *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*), *C. guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondi*), *Candida lusitaniae* (*Clavispora lusitaniae*), *C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*), *Candida pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*)’un taksonomik düzenlemesi yapılarak, yeniden isimlendirilmiş ve diğer cinsler içine taşınmıştır (Kidd ve ark., 2016). Ancak son yıllarda ilerleyen sistematik moleküler biyoloji çalışmalarının ışığı altında *Candida* türlerinin taksonomisinde önemli bazı değişiklikler bildirilmiştir (Howard, 2003; Kidd ve ark., 2016) .

Antijen yapıları bakımından *C. albicans* A ve B tiplerine ayrılmaktadır. Antijen yapıları, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından *C. albicans*’a benzerlik gösteren *Candida stellatoidea*’nın moleküler çalışmalarla tip I ve tip II alt tipleri belirlenmiştir. Tip I genetik özellikleri bakımından *C. albicans*’dan farklıdır ve bu nedenle *C. albicans*’ın mutanti olmadığı, Tip II’nin ise sukroz negatif mutanti olduğu düşünülmektedir (Kwon-Chung ve ark., 1989). Tip II’nin hem tip I *C. stellatoidea*, hem de *C. albicans*’dan daha yavaş ürediği ve daha az virüent olduğu bildirilmiştir (Kwon-Chung ve ark., 1988). Germ tüp testinde negatif sonuç veren *C. albicans* izolatlarının küçük bir yüzdesini oluşturan *Candida langeronii* ve *Candida clausenii*, *C. albicans*’ın sinonimleri olarak düşünülmektedir (Pujol ve ark., 1997; Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999). *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. kefyr* gibi bir kaç tür hariç, klinik olarak önem taşıyan *Candida* cinsi mayaların henüz çoğunun eşeyli (teleomorf) şeklinin bilinmemesi bu organizmaların sınıflandırılmasını güçleştirmektedir (Pujol ve ark., 1997; Sullivan ve ark., 1996).

Tablo 2.1. Blastomycetes ve Endomycetes sınıfları içinde yer alan önemli mayaların sınıflandırılması (Howard, 2003).

Sınıf	Takım	Telemorf-cins-türler	Anamorf
Endomycetes	Saccaromycetales	<i>Arxiozyma telluris</i>	<i>Candida pintolopesii</i>
		<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i>
		<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
		<i>Clavispora capitatus</i>	<i>Blastoschizomyces capitatus</i>
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>
		<i>Galactomyces geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
		<i>Hansenula anomala</i>	<i>Candida pelliculosa</i>
		<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida krusei</i>
		<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida sphaerica</i>
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefyri</i>
		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Candida pulcherrima</i>
		<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
		<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>
		<i>Pichia jadinii</i>	<i>Candida utilis</i>
		<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Candida valida</i>
		<i>Pichia norvegensis</i>	<i>Candida norvegensis</i>
		<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	
		<i>Saccaromyces exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>
		<i>Stephanoascus ciferrii</i>	<i>Candida ciferrii</i>
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>
Blastomycetes	Sporobolomycetales		<i>Sporobolomyces</i>
	Cryptococcales		<i>Blastoschizomyces</i>
			<i>Candida</i>
			<i>Cryptococcus</i>
			<i>Malassezia</i>
			<i>Rhodotorula</i>
	<i>Trichosporon</i>		

2.1.2. *Candida*'ların Morfolojisi

Candida'lar Gram-pozitif, 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, ince duvarlı, oval, kapsülsüz, hareketsiz, lateral tomurcuklanma (blastospor) ile aseksüel olarak üreyen fakültatif anaerob mayalardır. *Candida*'lar maya formu yanısıra kültür ve dokularda yalancı hifa veya gerçek hifa oluşturabilirler. Yalancı hifalar tomurcuklanma sırasında meydana gelir. Oluşan yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz bir yapı oluşturur. Gerçek hifalar ise maya hücresinden veya hifanın bir dalından oluşabilir; boğumlanma göstermez, apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (Calderone, 2002; Koneman ve ark., 1997). *C. albicans* ve çok seyrek izole edilen *Candida dubliniensis* gerçek hifa oluştururken, diğer *Candida* türleri yalancı hifa oluşturur (Calderone, 2002).

Birçok *Candida* türünün koloni morfolojisi benzerdir. Beyaz veya krem renğinde, parlak ve 4-5 mm büyüklüğündeki konveks koloniler, 3 gün inkübasyon sonrasında görülürler. İndikatör madde bulunan besiyerlerine ekimleri yapıldığında klinik olarak önemli *Candida* türleri koloni görünümüne göre birbirlerinden ayrılabilirler (Çiçek ve ark., 2014; Pincus ve ark., 2007). İçlerinde türe özgü kromojenik substratlar bulunan besiyerlerinde mayaların ürettiği enzimlerle (β -N-acetylhexosaminidase) bu substratlar reaksiyona girerek çeşitli renklerde koloniler oluştururlar (Çiçek ve ark., 2014).

2.2. *Candida*'ların Patogenezi ve Virülens Faktörleri

Candida türleri insan ve hayvanların deri, mukoza ve sindirim sisteminde flora etkeni olarak bulunan mikroorganizmalardır (Quinn ve ark., 2011). Hayvanlarda mastitis, dermatitis, vajinitis, abortus, otitis eksterna, artritis ve diyareye, immun sistemi baskılanmış insanlarda da deri, mukoza ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedirler (Foley ve Schlafer, 1987; Seyedmousavi ve ark., 2015; Songer ve Post, 2005). *Candida* enfeksiyonlarındaki tablolar, konağa ve etkene ait faktörlere (virülens faktörleri) bağlı olarak farklılık göstermektedir (Yücesoy, 1999).

Konağa ait faktörler, *Candida* enfeksiyonlarını kolaylaştıran faktörler ve konağın direnç durumu olmak üzere iki grupta incelenir (Yücesoy, 1999). Enfeksiyonu kolaylaştıran faktörler arasında immunsupresif, sitotoksik ilaçlar veya antibiyotiklerle sağaltım, madikal aletlerin kullanılması (katater, intraket vs), ağır cerrahi uygulamalar, AIDS, diyabet, hematolojik ve endokrinolojik hastalıklar, uyuşturucu kullanımı ve tümörler yer almaktadır (Dixon ve ark., 1996; Kojic ve Darouiche, 2004; Pincus ve ark., 2007; Ramla ve ark., 2015; Shoham ve Marr, 2012; Sweet ve ark., 1995; Teoh ve Pavelka, 2016). Konağın enfeksiyona karşı direnç faktörleri arasında deri ve mukoza bütünlüğü, fagositoz, fagositik öldürme mekanizmaları, defensin, lizozim, proliferasyon, nötrofiller, proteaz inhibitörleri, trombositler, komplement hücre bağımlı immunité ve humoral immunité yer almaktadır (Odds, 1994; Yücesoy, 1999).

Candida enfeksiyonlarında ikinci önemli unsur ise etkene ait virülens faktörleridir. *Candida*'ların farklı suşları farklı seviyelerde virülens özelliğine sahiptir. Adhezyon, biyofilm oluşturma, dokuya enzimlerle invazyon, ekstrasellüler proteinler, dimorfizm, antijenik çeşitlilik, hücre yüzey hidrofobitesi, moleküler benzeme ve hücre duvar yapısı *Candida* türlerinin virülens faktörleri arasında yer alır (Martínez ve ark.,1998; Yücesoy, 1999).

İnsan ve hayvanların normal florasında bulunan *Candida* türleri yüzeysel enfeksiyonlardan sistemik enfeksiyonlara kadar bir çok enfeksiyona yol açabilirler (Quinn ve ark., 2011). Sağlıklı insan ve hayvanlarda *Candida* enfeksiyonlarına karşı doğal direnç bulunur. *C.albicans*, patogeneze katkıda bulunan birçok virülens faktörüne sahiptir. Adhezinler, morfogenezis, aspartil proteaz ve fosfolipaz enzimleri en önemlileridir. (Calderone ve Fonzi, 2001). Ayrıca toksinler, fenotip değişimi, hücre duvarı, yüzey değişimi, hidrofobisite biyofilm gibi faktörler de virülenste rol oynarlar (Tsuboi ve ark., 1994).

2.2.1.Adhezyon

Adhezyon *C. albicans*'ın konak hücrede kolonizasyonu ve enfeksiyonu için ilk basamaktır ve hücre yüzey glikoproteinlerini kodlayan aglütinin benzeri sekans

(ALS) genlerinin ekspresyonu ile ilişkilidir (Abacı ve Haliki, 2004). İmmunokimyasal boyamalar ile ALS genlerinin *C. albicans*'ın hücre duvarında lokalize olduğu gösterilmiştir (Green ve ark., 2004). ALS gen ailesi, *C. albicans*'ın cansız yüzeylere ve konakçı hücrelere tutunmasını sağlar (Mayer ve ark., 2013). ALS, *C. albicans* içinde enzimatik aktivitesi bulunmayan tek gen ailesidir. ALS genleri ilk kez *C. albicans* izolatlarında belirlenmiş, daha sonra bu genler diğer mantarlarda da gösterilmiştir (Hoyer ve Cota, 2016). ALS proteinleri arasında yapısal ortaklık olmasına rağmen işlevleri açısından farklılıklar vardır. Bu aile, hücre yüzeyine bağlanan benzer yapıya sahip proteinleri kodlayan en az sekiz ALS genini (ALS1-ALS7, ALS9) içerir (Green ve ark., 2004). Genler keşfedilme sıralarına göre isimlendirilmiştir (Hoyer ve Cota, 2016). Yapılan çalışmalarda ALS3 ve ALS8 genlerinin aynı gen olduğu belirlenmiş ve ALS8 geni bu aileden çıkarılmıştır (Green ve ark., 2004). ALS1, ALS3 ve ALS5 mantarların hifa formunda bulunur ve konakçı dokusundaki laminin, fibronektin, kollajen, epitelyum ve endotellere bağlanmada rol oynar. ALS6 kollajene, ALS9 laminine bağlanmada rol alırken, ALS4 endotellere bağlanır. ALS5 ayrıca hücre agregasyonu için gereklidir (Karkowska-Kuleta ve ark., 2009; Khan ve ark., 2000; Mayer ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda ALS1 geninin enfeksiyonun erken safhalarında *C. albicans*'ın adhezyonunda önemli rol oynadığı (Kamai ve ark., 2002) ve ALS1 ve ALS3 genlerinin biyofilm formasyonunda birlikte daha fazla etkili oldukları bildirilmiştir (Nobile ve ark., 2008). ALS2 ve ALS9'un vajinal enfeksiyonlarda adhezyonda ve biyofilm oluşumunda önemli role sahip olduğu rapor edilmiştir (Rahimi ve ark., 2013).

Nas ve ark. (2008) vulvavajinal kandidiazisli kadınlardan izole edilen 29 *C. albicans* suşunun 20 (%69)'sinde, Revers-Transkriptaz-PZR (RT-PZR) ile ALS1 belirlediklerini rapor etmişlerdir. İnci ve ark. (2013) çeşitli klinik örneklerden (deri, idrar, kan, peritoneal ve serebrospinal sıvı, solunum sistemi ve vaginal sıvı) izole edilen 206 *C. albicans* izolatının %53,9'unda ALS1 geninin belirlendiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Roudbarmohammadi ve ark. (2016) RT-PZR ile vulvavajinal kandidiazisli hastalardan elde edilen 43 *C. albicans* suşunun 40'ında ALS1, 41'inde ALS3, 39'unda ise hem ALS1 hem de ALS3 gen varlığını saptamış, bu genlerin *C. albicans*'ın vaginaya tutunmasında ve biyofilm oluşumunda rol

oynayabileceğini bildirmişlerdir. Monroy-Pérez ve ark. (2016) ise vulvavaginal kandidiazisli hastalardan izole edilen 39 *C. albicans* suşunun tümünde *ALS1* ve *PLB1* genini saptamışlardır. Ali ve ark. (2015) Irak'ta hastalardan izole edilen 25 *C. albicans* suşunun 12 (%48)'sinde *ALS1* belirlemişlerdir. İnsanlardan izole edilen *C. albicans* suşlarında *ALS1* gen varlığının belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmasına karşılık, hayvanlarda yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır. Mastitisli ineklerden izole edilen *C. albicans* izolatlarında *ALS1* gen varlığının araştırıldığı bu çalışmada (Mousa ve ark., 2016) ise, sütlerden izole edilen 5 *C. albicans* suşunun 2'sinde *ALS1* geni saptanmış, sağlıklı sütlerden izole edilen suşta bu genin bulunmadığı bildirilmiştir.

Adhezyonda rol oynayan hifa duvar proteini (*HWP1*) geni, germ tüpü spesifik gen olup, bir yüzey proteinini kodlamaktadır (Abacı ve Haliki, 2004; Sharkey ve ark., 1999). *C. albicans*'ın *in vivo* biyofilm formasyonu için gerekli hücre yüzey proteindir (Nobile ve Mitchell, 2006). Ayrıca hifa gelişimi ve maya hücrelerinin epitel hücrelere yapışması için gereklidir (Orsi ve ark., 2014). *HWP1* mRNA mayalarla karşılaştırıldığında *in vitro* hifalarda bulunmaz. *HWP1*'e konakçı antikor cevabı ölçülmüştür. Bu durum *C. albicans*'ın asemptomatik enfeksiyonlarda hifa formları için önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Naglik ve ark., 2006). Tsuchomori ve ark. (2000)'larının yaptığı bir çalışmada intravenöz olarak homozigot *HWP1* bulundurmayan *C. albicans* mutanı (CAL3) ile enfekte edilen fareler 14 günden fazla sağ kalırken, *HWP1* ihtiva eden bir kontrol suşu ile enfekte edilen farelerin 3-5 gün hayatta kaldığı bildirilmiştir. Bu durum *HWP1* geninin *C. albicans*'ın patojenitesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Tsuchimori ve ark., 2000).

2.2.2. Dimorfizm

C. albicans kültürde tomurcuklanan maya hücreleri ve hifalar şeklinde gelişebilen dimorfik bir mantardır (Quinn ve ark., 2011). *C. Albicans*, *Candida* türleri içinde miselyum oluşturarak üreyebilen tek türdür. *C. albicans* maya ve hifa formu arasında geri dönüşümlü olarak geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir. Çeşitli koşullara bağlı olan bu morfolojik değişim maya (blastospor), germ tüpü, yalancı

hifa ve gerçek hifa oluşumunu kapsamaktadır (Molero ve ark., 1998; Odds, 1985). Morfoloji, 37°C'lik fizyolojik sıcaklığa, pH değerine, CO₂ konsantrasyonuna ve hifa gelişimini uyarıcı serum veya karbon kaynaklarının varlığına bağlı olarak değişebilir (Karkowska-Kuleta ve ark., 2009). Hifa oluşumu konak ortamı taklit edilerek yani 37°C'de serum veya nötr pH ile uyarılır (Mitchell, 1998). Yeni oluşturulan hifalar (germ tüpleri), maya formuna göre konak hücrelerine daha fazla tutunur ve doku penetrasyonu artırır (Cutler, 1991; Mitchell, 1998). Makrofajlar tarafından yutulan maya hücreleri hifalar üreterek makrofajları lize eder. Bu durum nötrofillerin hifaları öldürmesini engellenmiş olur (Cutler, 1991).

2.2.3. Enzimler

Fosfolipaz (*PL*), salgısal aspartik proteinaz (*SAP*), asit fosfatase, esteraz ve glukozilaz *C. albicans*'a ait enzimlerdir. Bu enzimlerin bazıları *C. albicans* tarafından salgılanan proteinlerdir, diğerleri ise hücre duvarı elemanı ya da hücrenin lizisi ile sitoplazmadan salgılanır (Martínez ve ark., 1998). Bu enzimlerden salgısal aspartik proteinazlar ve fosfolipazlar virülensle ilişkilendirilmiş iki büyük enzim ailesidir (Calderone ve Fonzi, 2001).

Fosfolipazlar hücre zarının yapısında bulunan gliserofosfolipidlerin bir veya daha fazla ester bağının hidrolizinden sorumludur. Bu yüzden fosfolipazların aktivitesi doku istilası sırasında çok yüksektir (İbrahim ve ark., 1995). Şimdiye kadar tanımlanan dört fosfolipaz (*PLA*, *PLB*, *PLC* ve *PLD*) vardır (Calderone ve Fonzi, 2001). *PLB1* ve *PLB2* genleri fosfolipaz enziminin ekstrasellüler sentezinden sorumludur. *PLA*'nın virülenste etkisinin olup olmadığı henüz belirlenmemiştir. *PLB* (özellikle *PLB1*) ve *PLD*'nin önemli virülens faktörleri olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Saha suşlarından *PLB1*'in çıkarılması ile yapılan çalışmalarda *PLB* aktivitesinin %99, lizofosfolipaz aktivitesinin %80 azaldığı bildirilmiştir (Leidich ve ark., 1998). Virülens için çok önemli olan, hem hidrolaz hem de lizofosfolipaz-transasilaz aktivitelere sahip olan *PLB*'nin aktivitesidir (Ghannoum, 2000; Yang, 2003). *PLB1* bulunmayan izolatların çok az *PLB* sentezlediği, bu nedenle de *PLB*'nin sentezinden daha çok *PLB1* geninin sorumlu olduğu, *PLB2*'nin ise çok az katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Ghannoum, 2000). Bu çalışmalar *C. albicans*'da *PLB*'nin

en önemli ekstrasellüler fosfalipaz olduğunu ortaya koymaktadır. Fosfolipazlardan sadece *PLB1*'in hayvan kandidiazis modellerinde virülans için gerekli olduğu bildirilmiştir (Navarro-García ve ark., 2001). *PLB1* aktivitesi doku invazyonu sırasında hifal uçlarda tespit edilmiştir (Ghannoum, 2000).

Naglik ve ark. (2003) insanların oral enfeksiyonlarından izole edilen 40 *C. albicans* suşunun 23'ünde ve vaginal kandidiazisli kadınlardan izole edilen 40 *C. albicans* izolatının 25'inde *PLB1* saptamışlardır. Buna karşın sağlıklı kişilerin ağızlarından ve vajinalarından alınan sıvaplardan izole edilen *C. albicans* suşlarından sırasıyla 4 ve 12'sinde *PLB1* geni saptanmıştır.

Hayvanlarda *PLB1* gen varlığının gösterilmesine yönelik literatür taramasında sadece iki çalışma bulunmuştur. Bu çalışmalarda mastitisli sütlerden izole edilen *C. albicans* suşlarının tümünde *PLB1* geninin saptandığı (Eldesouky ve ark., 2016; Mousa ve ark., 2016), sağlıklı sütlerden izole edilen suşlarda ise tespit edilemediği (Mousa ve ark., 2016) rapor edilmiştir. Hakim ve ark. (2016) Mısır'da Kareish peynirlerinden izole edilen *C. albicans* izolatlarının tümünde *PLB1* geninin bulunduğunu bildirmişlerdir.

C. albicans izolatlarında salgısal aspartat proteinaz (*SAP*) enziminin üretimi ilk kez Staib tarafından 1965'de bildirilmiştir (Staib, 1965). *SAP* enzimi *C. albicans* yanı sıra diğer *Candida* türleri tarafından da sentezlenmektedir (Naglik ve ark., 2003). *Candida* türlerinin amonyum bulunmayan ortamlarda azot kaynağı olarak sadece protein içeren besiyerlerinde *SAP* salgıladıkları saptanmıştır (Banerjee ve ark., 1991). *C. albicans*'ın proteinaz enzimlerinin esas görevi enfeksiyon sırasında maya hücreleri için gerekli besinleri sağlamak, immunglobülin ve komplement proteinlerini bozarak konak savunma mekanizmalarından kaçmak ve konak dokularına adhezyon ve invazyondur (Naglik ve ark., 2003). *C. albicans* suşlarında *SAP* ailesini oluşturan 10 *SAP* geni belirlenmiştir. *SAP* gen ailesinde yer alan genlerin çevre koşullarına bağlı olarak farklı şekillerde eksprese olabileceği ve *C. albicans* enfeksiyonlarına farklı şekillerde katkıda bulunabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002; Naglik ve ark., 2008; Staib ve ark., 1999). *SAP1* ve *SAP3* genlerinin deneysel olarak *C. albicans* ile vajinitis

oluşturulmuş ratlarda enfeksiyonun erken safhasında maya hücre duvarlarında tesbit edildiği bildirilmiştir (Naglik ve ark., 2003). Aynı zamanda bu genlerin mukozal doku sindiriminde önemli rol oynamadığı belirlenmiştir (Naglik ve ark., 2008). *SAP* genleri ile ilgili çalışmalarda en çok *SAP2* geni üzerinde durulmuş, *SAP2* geninin enfeksiyonun başlangıç safhalarında tesbit edilemediği, enfeksiyonun geç safhasında, yani derin dokulara yayıldıktan sonra güçlü bir şekilde eksprese edildiği saptanmıştır (Staib ve ark., 1999). *SAP* genlerinin farklı morfolojik formlarda farklı şekillerde eksprese edilebileceği bildirilmiştir (Naglik ve ark., 2003). *SAP1*, *SAP2* ve *SAP3*'ün sadece maya formunda, *SAP4* ve *SAP6*'nın nötral pH'da hifa formunda, *SAP9* ve *SAP10*'un bağımsız olarak hem maya hem de hifa formlarında bulunduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2002; Hube ve ark., 1994; Naglik ve ark., 2008). *SAP5* maya enfeksiyonunun erken safhasında ve hifa formasyonu süresince nötral PH'da saptanabilir (Chen ve ark., 2002). *SAP5*'in hifal invazyonda indirek rol oynadığı ancak, direk olarak epitel hasarına yol açmayabileceği bildirilmiştir (Naglik ve ark., 2008). Tek bir *SAP* geninin *C. albicans*'ın konakçı dokularına invazyon ve hasarında etkili olmadığı, *SAP* gen ailesinin tamamının varlığında invazyon ve doku zararlarının arttığı, özellikle de *SAP4* ve *SAP6* genlerinin en önemli virülens faktörleri olduğu gösterilmiştir (Naglik ve ark., 2008).

2.2.4. Biyofilm

Canlı veya cansız yüzeye yapıştıktan sonra, ürettikleri polisakkarit matriks tabaka içinde gömülü olarak yaşayabilen mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk biyofilm olarak isimlendirilmektedir (Altun ve Şener, 2008). Birçok *Candida* türü bakterilerdeki gibi dokulara ve cansız ortamlara tutunmasını ve kolonizasyonunu sağlayan matriks yapısını oluşturabilmektedir (Mukharjee ve Chandra, 2004). Aygıtlarla ilişkili enfeksiyonlar bakteri ve mantarların biyofilm oluşturma yetenekleriyle ilişkilidir (Kojic ve Darouiche, 2004; Ramage ve ark., 2005). İnsanlarda yapılan çalışmalarda katater, travma, takma diş, ses protezi ve kontakt lensle ilişkili enfeksiyonlarda *Candida* türleri izole edilen en yaygın mantarlar olduğu bildirilmiştir (Kojic ve Darouiche, 2004; Kuhn ve Ghannoum, 2004; Nicastri ve ark., 2001). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar antibiyotiklere, antifungallere, dezenfektanlara ve konakçı immun sistemine direnç gösterdikleri için

enfeksiyonların patogeneğinde önemli virülens faktörleri oldukları düşünülmektedir (Mukharjee ve Chandra ve ark., 2004; Ramage ve ark., 2005). *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin farklılık gösterdiği (Şeker ve Özenç, 2011), *C. albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin, non *C. albicans* izolatlarından daha fazla olduğu bildirilmiştir (Nerurkar ve ark., 2012). İnsanların *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde biyofilm oluşumunun önemli rol oynadığı bilinmesine karşın (Douglas, 2003; Gökce ve ark., 2007; Ramage ve ark., 2005), hayvanlar ve hayvansal ürünlerden elde edilen *Candida* türlerinin patogeneğindeki rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Türkiye’de yapılan bir çalışmada, mastitisli manda sütlerinden izole edilen *Candida* türlerinde *in vitro* biyofilm aktivitesi araştırılmış, *C. krusei* ve *C. albicans* izolatlarının tümünün biyofilm oluşturduğu, izole edilen diğer *Candida* izolatlarının değişen oranlarda biyofilm aktivitesi oluşturduğu bildirilmiştir (Şeker ve Özenç, 2011).

2.2.5. Fenotipik değişim

C. albicans kolonileri stres altında iken kendiliğinden düzgün, halka, yıldız, çizgili şapka, buruşuk ve tüylü gibi morfolojik değişimler gösterirler. Bu durum *C. albicans*’ın hücre yüzeyi özelliklerinde, koloni görünümünde, metabolik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinde değişikliklere ve bu değişiklikler de enfeksiyon sürecinde daha virulent ve etkin olmalarına yol açmaktadır (Çerikçioğlu, 2012).

C. albicans’ın fenotipik değişimi ilk olarak farklı frekanslarda UV ışığı kullanılarak, smooth ve rough kolonilerin birbirlerine dönüştürülmesi ile gösterilmiştir (Pomés ve ark., 1985). Maya hifa geçişinden farklı olarak, aynı çevresel koşullarda aynı popülasyondaki bazı hücreler farklı fenotipler oluşturabilirler. Bu sürecin moleküler temeli tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, kromozomal yeni düzenlemelerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Çerikçioğlu, 2012). Slutsky ve ark. (1985) *C. albicans*’ın 3153A suşunu kullanarak orijinal smooth, yıldız, halka, düzensiz kırışık, alacalı, şapka, bulanık ve revertant smooth dâhil olmak üzere ek koloni tiplerinin gözlenebildiğini bildirmişlerdir.

Tanımlanan tüm fenotipik değişimlerden en çok çalışılan düzgün ve beyaz kolonilerin opak kolonilere geçtiği WO-1 suşunun kullanıldığı beyaz-opak sistemidir (Slutsky ve ark., 1987). Beyaz koloniyi oluşturan *C. albicans*'ın morfolojisi yuvarlak ve oval, opak koloniyi oluşturanların ise uzamış ve fasülye şeklinde olduğu gösterilmiştir. Beyaz koloniyi oluşturan maya hücrelerinin 37°C'de pH 6,7'de germ tüpü oluşturduğu, opak koloniyi oluşturan hücrelerin ise insan epitel hücreleri dışında germ tüpü oluşturamadığı bildirilmiştir (Anderson ve ark., 1990; Slutsky ve ark., 1987). Beyaz-opak koloni değişimi sırasında farklı genlerin eksprese edildiği, opak fazda opak faz spesifik (*OPA1*), *SAP3* ve *Op4* genlerinin, beyaz fazda ise *WH11* genlerinin eksprese edildiği bildirilmiştir (Srikantha ve ark., 1995).

Fenotipik değişim *C. albicans*'ın hücre yüzey antijenlerini değiştirerek konağın immun sisteminden korunmasını veya mukozaya adhezyonunun değişmesini ve bu sayede spesifik vücut bölgelerine adaptasyonunu sağlar (Srikantha ve ark., 1995).

2.2.6. Hücre Duvarı

Hücre duvarı, çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynayan önemli ve oldukça dinamik bir mantar yapısı olup, hücre morfolojisinin korunmasını sağlar. Hücre duvarı antijenik olup, enfeksiyona karşı immünolojik cevabın verilmesinde, adhezyon ve dolayısıyla kolonizasyonda rol oynar (Navarro-García ve ark., 2001).

2.2.7. Toksinler

C. albicans tarafından üretilen toksinler yüksek moleküler ağırlıklı toksinler (glikoproteinler ve kandidotoksin) ve düşük moleküler ağırlıklı toksinler olmak üzere iki gruba ayrılır (Ghannoum ve Abu-Elteen, 1990). Glikoprotein molekülünün hem protein hem de şeker kısımlarının toksik aktivite için gerekli olduğu, mannan ile birlikte önemli bir rol oynadığı ve yardımcı protein olarak davrandığı öne sürülmüştür (Iwata ve ark., 1975). *C. albicans* glikoproteinleri, özellikle mannoproteinler toksik etkilerinin yanında, vücut yüzeyini kolonize eden adhezinler olarak öne çıkmaktadır (Al-Bassam ve ark., 1985; Elorza ve ark., 1985). Yapılan

hayvan deneylerinde kandidoksinin sitotoksik, farmakolojik, immunolojik, enzimatik ve enfeksiyon arttırıcı aktiviteleri belirlenmiştir (Iwata ve ark., 1975). Düşük moleküler ağırlıklı toksinler kandidoksin üreten *C. albicans* suşlarından izole edilmiştir. Bu bileşikler birbirlerine çok benzerdir ve şok oluşturan veya ölümcül aktivite gösterenler olarak ikiye ayrılır (Iwata ve ark., 1975).

2.3. *Candida* Enfeksiyonları

Tüm mantar enfeksiyonları arasında en sık izole edilen tür *Candida*'dır. *Candida*'lar deri, gastrointestinal, üst solunum ve genitoüriner sistemin normal flora üyeleridir ve fırsatçı patojenlerdir (Foley ve Schlafer, 1987; Seyedmousavi ve ark., 2015; Songer ve Post, 2005). *Candida* cinsinin 200'den fazla türü bilinmektedir. Bilinen en patojen tür *Candida albicans*'tır (Quinn ve ark., 2011). *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türleri (*C. tropicalis* ve *C. glabrata*) insanların ağız, gastrointestinal sistem ve vajinasında flora üyesi olarak bulunurken, diğer *Candida* türleri çevrede bulunurlar (Howard, 2003). Çeşitli nedenlerle immun sistemi baskılanmış hastalardan veya uzun süreli antibiyotik tedavileri sonrası hastaların maya enfeksiyonlarından sıklıkla *Candida* türleri izole edilmektedir. Nozokomiyal maya enfeksiyonlarından *C. albicans* (Perlroth ve ark., 2007; Şahiner ve ark., 2011), *C. glabrata* (Berrouane ve ark., 1999; Fidel ve ark., 1999; Şahiner ve ark., 2011), *C. krusei* (Hautala ve ark., 2007), *C. parapsilosis* (Kuhn ve ark., 2004; Şahiner ve ark., 2011), *C. tropicalis* (Kothavade ve ark., 2010; Şahiner ve ark., 2011) ve *C. lusitaniae* (Hawkins ve Boddour, 2003), *C. inconspicua* (Guitard ve ark., 2015) izolasyonları bildirilmiştir. Bu mayalar yüzeysel veya sistemik enfeksiyonlara neden olurlar (Pendrak ve Klotz, 1995). Konağın bağışıklık yanıtı, *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyon tipinin belirleyici faktörüdür (Miceli ve ark., 2011). *C. albicans* hayvan enfeksiyonlarında da en sık karşılaşılan *Candida* türüdür (Quinn ve ark., 2011). Yüzeysel mukozal *Candida* enfeksiyonları; pamukçuk, deri kandidiazisi, *Candida* özefajiti, non-özefagiyal gastrointestinal kandidiazis, sistit ve vulvovajinal kandidiazistir. Sistemik *Candida* enfeksiyonları ise kandidemi ve çeşitli organ ve doku (kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, kas, kemik, eklem vb.) kandidiazisidir (Seyedmousavi ve ark., 2015; Sönmez ve ark., 1997). *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis* ve *C. krusei* hayvanlarda arthritis, mastitis ve abort gibi enfeksiyöz

hastalıklara yol açan en önemli *Candida* türleri olmakla birlikte, diğer *Candida* türlerinin de enfeksiyonlardan izole edildiği bildirilmiştir (Cohen ve ark., 2008; Dworecka-Kaszak ve ark., 2012; Eldesouky ve ark., 2016; Mousa ve ark., 2016; Stefanetti ve ark., 2014; Şeker, 2010; Şeker ve Özenç, 2011). *Candida* türleri kedi ve köpeklerde dermatitis, enteritis, otitis eksterna ve iç organ enfeksiyonlarına yol açabilir (Ali ve ark., 2015; Duchaussoy ve ark., 2015; Milner ve ark., 1997; Moretti ve ark., 2004; Şahan-Yapıcıer ve ark., 2018). Kanatlılarda en sık etkilenen organlar; gaga, özefagus, kursak, bezli ve kaslı midedir. Bu organlarda pamukçuk, psödomembranöz ülser ve beyaz plak şeklinde lezyonlar oluştururken (Hörmansdorfer ve Bauer, 2000; Velasco, 2000), nadiren, deri, ayak, perikard ve kloakada da lezyonlar gözlenebilir (Velasco, 2000).

Mastitis sığır sürülerinde en sık karşılaşılan, süt veriminde azalma ve kalitesinde bozukluklara yol açan ve tüm dünyada ekonomik öneme sahip bir hastalıktır (Aydın ve ark., 2006). Mastitisin etiolojisinde birçok bakteri bildirilmekle birlikte, maya ve maya benzeri mikroorganizmalar da sığır mastitislerine yol açmaktadır (Costa ve ark., 1993; Dworecka-Kaszak ve ark., 2012; Krukowski ve ark., 2000; Santos ve Marin, 2005; Şeker, 2010). Mayaların neden olduğu mastitisin prevalansı, diğer etiyojik ajanlarla karşılaştırıldığında genellikle düşük olmasına rağmen (Czernomysy-Furowicz ve ark., 2008; Santos ve Marin, 2005; Wawron ve ark., 2010) son yıllarda önemli derecede artış gözlenmektedir (Dworecka-Kaszak ve ark., 2012). *C. albicans* ve *C. neoformans* mastitisli sütlerden en sık izole edilen maya etkenleridir ve (Costa ve ark., 1993; Eldesouky ve ark., 2016; Pachauri ve ark., 2013; Zaragoza ve ark., 2011) diğer *Candida* türleri de mastitisli sütlerden izole edilmiştir (Santos ve Marin, 2005; Sartori ve ark., 2014; Şeker, 2010; Wawron ve ark., 2010).

Mantarlar toprakta bulunur ve meme derisini küçük sayılar halinde kolonize edebilirler. Doğal savunma mekanizmalarının azalmasıyla enfeksiyon geliştirirler (Sartori ve ark., 2014). Kontamine sütün makine veya elle sağılması, hayvan sahipleri ve veteriner hekimler tarafından gelişigüzel ve sık antibiyotik kullanımı, kontamine antibiyotik preparatları, kanül ve enjektörlerin meme içi kullanımı maya enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Dworecka-Kaszak ve ark., 2012). *C. albicans* ve

sporları pastörizasyondan kurtulma yeteneğine sahiptir ve bu yüzden halk sağlığı için önemli kabul edilir (Schmitt, 1971; Tarfarosh ve Purohit, 2008).

2.4. *Candida*'ların İzolasyon ve İdentifikasyonu

2.4.1. Direk Mikroskopik İnceleme

Deri ve tırnak kazıntıları, lam üzerinde bulunan iki damla %10-20 KOH solüsyonuna batırılıp üzeri lamelle kapatılır. Hidrolizasyonu hızlandırmak için çok hafif alttan ısıtılır. Hidrolizasyonun tamamlanması için 30-60 dakika beklenir ve preparat önce küçük büyütme (100x-200x), sonra büyük büyütme (450x-500x) ile muayene edilir (Arda, 2015). Bu yöntem mantar ve maya hücrelerini teşhis etmede en yaygın kullanılan yöntemdir (Madhavan ve ark., 2011).

İdrar, irin ve eksudatlardan, hem direkt, hem de kuvvetli santrifüj (4000 dev/dk, 15-20 dk) sonrası elde edilen tortudan preparatlar hazırlanır ve %10-20 KOH ile muamele edilip mikroskop altında muayene edilirler. Preparatların bir kısmı ise Gridley, PAS, Giemsa, Gram ve Ziehl-Neelsen gibi boyama yöntemlerinden biri ile boyanarak incelenir (Arda, 2015).

Spinal sıvılar, kuvvetli santrifüj edildikten sonra dipteki tortudan hazırlanan preparatlar boyanmadan ya da çeşitli boyama yöntemlerinden (Gram boyama, çini mürekkebi vb.) biri ile boyanarak mikroskopta incelenir (Arda, 2015).

Kandan hazırlanan preparatlar PAS, Gomori, Giemsa, Gridley, Gram, Ziehl-Neelsen gibi boyama yöntemlerinden biri ile boyanarak mikroskop altında muayene edilir (Arda, 2015).

Kraşe ve bronşiyal eksudatlar, önce steril fizyolojik tuzlu su içinde 3-4 kez yıkanarak oral flora ve yabancı materyallerin uzaklaştırılması sağlanır. Yıkanan materyallerden hazırlanan preparatlar, hem direkt hem de boyanarak mikroskop altında muayene edilir (Arda, 2015).

Biyopsi materyalleri, %10 formalin ile tespit edilerek histolojik muayeneler için kullanılır. Hazırlanan kesitler Gridley, PAS, Gomori gibi boyalardan biri ile boyanarak incelenirler (Arda, 2015).

2.4.2. Kültür

Candida türlerini izole etmek için kullanılan temel besiyerleri kanlı agar, Potato Dekstroz agar (PDA), Potato Dekstroz buyyon (PDB), Sabourraud Dekstroz agar (SDA), Sabourraud Dekstroz buyyon (SDB), Yeast Nitrogen Base (YNB), Yeast Potato Dekstroz agar (YBDA)ve Yeast Potato Dekstroz buyyon (YPDB)'dur. Selektif ve diferansiyel besiyerleri de *Candida*'ları üretmek ve birbirinden ayırt etmek için kullanılabilir (Madhavan ve ark., 2011; Pincus ve ark., 2007).

İlk izolasyon için, bileşiminde kloramfenikol ve sikloheksamid bulunan SDA kullanılır. Bu besiyerinin pH'sı düşük olduğundan ve içerdiği antibakteriyel ve antifungal substanslardan dolayı, çoğu bakterilerin ve saprofitik mantarların üremesini engeller. Ortama aktidon (0,5 g/l), kloramfenikol (0,5 g/l) veya bunun yerine streptomisin (40 mcg/ml) ve penisilin (20 IU/ml) karışımı ilave edilebilir (Arda, 2015).

Kutan mikozis olgularında gönderilen materyaller petri kutusundaki besi yerinin 4-5 noktasına steril pens yardımıyla ekilir. (Arda, 2015).

Subkutan ve sistemik mikozis olgularında gönderilen materyaller (vezikül sıvıları, irin, burun akıntısı, süt gibi) petri kutusundaki katı besiyerinin yüzeyine iyice yayılarak ekilir. Serebrospinal sıvı, pleural ve peritoneal eksudatlar hem santrifüj edildikten sonra tortudan ve hem de santrifüje edilmeden ekimleri yapılır. Eğer doku materyali ise doku parçaları iyice ezildikten veya çok küçük parçalara ayrıldıktan sonra ekimi yapılır. Ekim için SDA kullanılsa da bunun yanında, beyin-kalp infüzyon agar veya aynı ortamın kanlı agarı ve Sabhi agardan da büyük ölçüde faydalanılır (Arda, 2015).

İzolasyon için kullanılacak besi yerleri, hastalık etkenini en iyi şekilde üretebilme yeteneğine sahip ve selektif olmalıdır. Aynı zamanda her türlü optimal üreme koşulları sağlanmalıdır. Antifungal maddeler, *Cryptococcus* ve *Candida* türlerinin üremesini inhibe edeceği için izolasyon ve identifikasyon besi yerlerinde bu maddeler bulunmamalıdır. Bütün ekimler çift olarak yapılmalı, biri oda ısısında (25-26°C), diğeri ise 37°C'de inkubasyona bırakılmalıdır (Arda, 2015).

Maya kolonileri, besi yerinde 24 saatte gözle görülebilecek kadar hızlı ürerler. Üremeleri için organik bir karbon ve azot kaynağına ihtiyaç duyarlar. Çoğu mayalar basit bir karbonhidrat olan glukozu parçalayabilirler. Bu yüzden mayaların üretilmesinde kullanılan primer besi yerlerinde glukoz bulunur. Mayalar aerob mikroorganizmalar olup, klinik örneklerin taşınması ve kültürü aerob koşullarda olmalıdır (Piyade, 2004).

Klinik öneme sahip maya türleri selektif besiyerlerde 24 saat, koyun kanlı agar ve diğeri non selektif besiyerlerde 36-72 saat içinde ürerler ve beyaz ya da sarı renkli, düzgün, parlak koloniler oluştururlar (Arda, 2015; Winn ve ark., 2006).

Mayaların hızlı bir şekilde identifikasyonunu sağlamak amacıyla kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Kromojenik besiyerleri arasında Albicans ID (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), Albicans ID2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), Candida diagnostic agar (PPR Diagnostics Ltd. London, UK), CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, Fransa), CandiSelect (Sanofi Diagnostics Pasteur, France) ve Chromalbicans (Biolife Italiana Srl, Milan, Italy) yer almaktadır (Çiçek ve ark., 2014; Pincus ve ark., 2007). İçlerinde türe özgü kromojenik substratlar bulunan bu besiyerlerinde, mayaların ürettiği enzimlerle (β -N-acetylhexosaminidase) bu substratlar reaksiyona girerek çeşitli renklerde kolonilerin oluşumu sağlanır (Çiçek ve ark., 2014). Bu besi yerleri birincil izolasyon ortamı için uygundur ve klinik olarak önemli *Candida* kolonilerinin hızlı ve etkili bir şekilde identifikasyonunu sağlar. Bu nedenle karışık kültürlerde *Candida* enfeksiyonlarının saptanması kolaydır (Çiçek ve ark., 2014). CHROMagar Candida besiyeri β -N-acetylhexosaminidase ve bir fosfataz substratını içeren besiyeridir ve *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*'in identifikasyonunda kullanılmaktadır (Pincus ve ark., 2007).

CHROMagar Candida besiyerinde yeşil koloni oluşturan mayalar PZR ile *C. albicans* olarak identifiye edilmiştir (Marinho ve ark., 2010). Kromojenik agar'da *C. albicans* ve *C. dubliniensis* aynı renk koloniler oluşturduğundan bu besiyerlerinde ayırt edilemezler (Feyzioğlu ve ark., 2014; Şahiner ve ark., 2011). Bazı araştırmacılar bu türler arasında koloni renk yoğunluğunda farklar bulunduğunu, *C. albicans* kolonilerinin soluk mavi yeşil, *C. dubliniensis* kolonilerinin ise koyu yeşil koloniler oluşturduğunu bildirmişlerdir (Marinho ve ark., 2010; Feyzioğlu ve ark., 2014).

C. dubliniensis ve *C. albicans*'ı ayırt etmek amacıyla 45°C'de üreme yeteneğine bakılmaktadır. *C. dubliniensis* bu ısıda üreyemezken, *C. albicans* üreyebilir (Marinho ve ark., 2010).

2.4.3. Germ Tüp Testi

İnsan ve hayvan maya enfeksiyonlarında en sık rastlanan tür *C. albicans*'tır. Germ tüp testi *C. albicans*'ın, diğer *Candida* türlerinden ayırımında kullanılan bir ön identifikasyon testidir (Winn ve ark., 2006). *C. albicans*'ı hızlı bir şekilde teşhis etmek için germ tüp testi ilk kez 1960'da tanımlanmış olup, neredeyse 60 yıldır kullanılmaktadır (Pincus ve ark., 2007). Germ tüp maya hücresinden 3-4 kat daha uzun, mayadan dışarıya doğru uzanan filament olarak tanımlanır. Germ tüp gerçek bir hifa yapısıdır ve pseudohifanın karakteristik yapısını taşımaz (Winn ve ark., 2006). Germ tüp testi; bir maya kolonisinin 0,5 ml tavşan ya da insan plazma veya serumu içinde 35°C'de 2 saat inkübe edilmesi ile yapılır. Bu süre sonunda süspansiyondan bir damla alınarak lam lamel arasında mikroskopta incelenir ve germ tüpü aranır (Winn ve ark., 2006). Germ tüpü varsa, *C. albicans* olarak ön identifikasyon yapılmış olur (Madhavan ve ark., 2011; Pincus ve ark., 2007; Winn ve ark., 2006). Klinik örneklerden izole edilen germ tüp testi pozitif *Candida* izolatlarının %90'ının *C. albicans* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir (Deorukhkar ve Roushani, 2018). *C. dubliniensis*, *C. albicans* gibi germ tüpü oluşturabilen diğer bir *Candida* türüdür (Kadry ve ark., 2018). *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'de germ tüp benzeri hifalar oluşturabilirler. Bununla birlikte tecrübesiz mikrobiyologlar bazen erken pseudohifa hücreleri ile gerçek germ tüpünü ayırt

edemezler (Marinho ve ark., 2010). *C. tropicalis*'te oluşan germ tüp benzeri yalancı hifaların, ana hücreden uzandığı bölgede daralma göstermesi ayırıcı tanıdır (Campbell ve ark., 1998; Perry ve ark., 1990).

2.2.4. Klamidospor Oluşturma

Candida izolatlarının klamidospor oluşturma özelliği Tween 80 ilave edilmiş/edilmemiş mısır unu ve pirinç unu besiyerlerinde gösterilir (Pincus ve ark., 2007). Bu besiyerleri kullanılarak mayaların blastospor, artrospor, pseudohifa ve hifa oluşturma özellikleri de incelenir (Karakoç ve ark., 2007). İzole edilen maya kolonisinden iğne uçlu  ze ile alınıp petri kabında birbirine paralel çizgiler şeklinde ekimler yapılır. Ekim alanlarının üzeri lamel ile kapatılır. Kapatılan lamel ile ortamın oksijeninin azalması ve Tween 80'in yüzey gerilimini d şurmesi klamidospor ve pseudohifa üretimini artırır (Piyade, 2004). Besi yeri 24-48 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Inkübasyon sonrasında mayaların mikroskopik morfolojik özellikleri incelenir (Fenn ve ark., 1994). Klamidosporların tespit edilmesi durumunda, maya *C. albicans* olarak identifiye edilir (Winn ve ark., 2006). Pseudohifa ve blastokonidia görülme durumunda, *Candida* cinsi içinde farklı bir tür olarak tanımlanır (Winn ve ark., 2006). *C. dubliniensis* de klamidospor oluşturma özelliğine sahiptir. *C. albicans* yalancı hifa üzerinde tek bir klamidospor oluştururken, *C. dubliniensis* klamidospor demetleri oluşturur (Seyer ve ark., 2009). *C. glabrata*'nın en karakteristik özelliği mısır unlu besi yerinde hifa veya pseudohifa görülmemesidir. *C. tropicalis* hifa oluşturabilir, nadiren klamidospor yapar (Akçam-Aysan, 2009).

2.4.4. Biyokimyasal Testler

2.4.4.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri

Mayaların tür düzeyine kadar olan identifikasyonunda karbonhidrat asimilasyon testi, esas dayanak noktasıdır (İnci ve ark., 2012, Kidd ve ark., 2016). Karbonhidrat asimilasyon testleri, klinik açıdan önemli mayaların kesin tanımlanması için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu test, maya izolatının kimyasal olarak tanımlanmış bir ortamda tek karbon kaynağı olarak belirli bir karbonhidrat

substratından yararlanma kabiliyetini belirler. Bu yöntemde, uygun bir karbonhidrat substratı eklendiğinde mayaların büyümesini destekleyen bir bazal ortam kullanılır. Büyümenin olmaması, test edilen karbonhidratın kullanılmasına yönelik enzim eksikliğine işaret eder (Sandven, 1990). Mayalar 30°C’de 24 saat YNB’de kültüre edilir. Kültürler 2790 RCF’de (rölatif santrifüj kuvveti) 5 dakika santrifüj edilir, 3 kez yıkanır ve McFarland Standart No. 5’e göre steril tuzlu su ile ayarlanır. 300 µl YNB ve 1,5 ml *Candida* spp. süspansiyonu, içinde falkon tüpü bulunan 30 ml steril bakteriyolojik agara karıştırılır. Süspansiyon 15 cm petri kutusuna dökülür ve besiyeri katılaştıktan sonra %2 oranında karbonhidrat (maltoz, trehaloz, ksiloz, galaktoz, laktoz, sukroz ve glukoz) emdirilmiş diskler petriye yerleştirilir. Süspansiyon 30°C’de 96 saat inkübe edilir ve her gün kontrol edilir. Tüm *Candida* türleri glukozu asimile ettiği için pozitif kontrol olarak glukoz kullanılır (Marinho ve ark., 2010). Disklerin etrafındaki maya üremesi karbonhidratın asimilasyonunu gösterir (Marinho ve ark., 2010). *C.albicans*’ın karbonhidrat asimilasyon profili tablo 2.2’de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. *C. albicans*’ın karbonhidrat asimilasyon profili (Kidd ve ark., 2016).

<i>C. albicans</i> ’ın karbonhidrat asimilasyon profili					
Glukoz	+	Eriyebilir nişasta	+	Galaktitol	-
Galaktoz	+	D-Ksiloz	+	D-Mannitol	+
L-Sorboz	D	L-Arabinoz	D	D-Glucitol	D
Sukroz	D	D-Arabinoz	D	α-M-D-Glukozid	D
Maltoz	+	D-Riboz	D	D-Glukonat	D
Sellobioz	-	L-Ramnoz	-	DL-Laktat	+
Trehaloz	D	D-Glukozamin	D	myo Inositol	-
Laktoz	-	N-A-D-Glukozamin	D	2-k-D-Glukonat	+
Melibioz	-	Gliserol	D	D-Glokuronat	-
Rafinoz	-	Eritritol	-	Nitrat	-
Melezitoz	D	Ribitol	D	Üreaz	-

+: pozitif, - : negatif, D: değişken sonuçları ifade eder

2.4.4.2. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

Karbonhidrat fermentasyon testleri, mayaların kesin identifikasyonunda zorluklar yaşandığında kullanılır. Mayalar etanol ve karbondioksiti oluşturmak için belirli bir karbonhidrat substratın anaerobik fermentasyonunu mümkün kılan enzimatik sistemlere sahiptir. Fermentasyon sadece gaz üretimi ile tespit edilir. Fermentasyon ortamı pepton, et veya maya ekstraktı ve birbirinden farklı karbonhidrat kaynakları içerir. Gaz üretiminin tespiti için ters çevrilmiş Durham tüpü yerleştirilir. İzole edilen saf maya kolonisinden steril tuzlu suyla süspansiyonları hazırlanır. Farklı karbonhidratların test edildiği her bir ortama hazırlanan süspansiyondan 0,2'şer ml ilave edilir. Tüpler 25-28°C'de 6-12 gün inkübe edildikten sonra sonuçlar not edilir. Pozitif fermentasyon, ters çevrilmiş Durham tüpünde gaz kabarcıklarının varlığı ile saptanır. Bir karbonhidrat fermente edilirse, aynı zamanda asimile de edilir ancak zıt durumlar da gözlenebilir. Fermentasyon testlerinin asimilasyon testlerine göre değişiklik gösterebileceği, bu nedenle de daha az güvenilirliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Sandven, 1990). *C. albicans* izolatlarının karbonhidrat fermentasyon testleri yapıldığında glukoz ve maltozu fermente ettiği, galaktoz, sukroz ve trehalozu değişen oranlarda fermente ettiği, laktozu ise fermente edemediği bildirilmiştir (Kidd ve ark., 2016).

2.4.4.3. Üreaz Testi

Üreaz enzimine sahip mayalar, üreyi alkalın reaksiyon oluşturmak üzere ayırma yeteneğine sahiptir. *C. albicans* üreaz üretememektedir (Kidd ve ark., 2016). Ancak, *Candida* türleri içinde sadece *C. krusei*'nin bazı izolatları üreaz pozitifdir. Üreaz üretme yeteneği, Christensen'in üre agarı ile belirlenir. Besiyerine maya kolonisinin bir kısmı inokule edilir. 25-30°C'de 4-5 gün boyunca inkübe edilir ve günlük takibi yapılır. Sarıdan pembeye veya kırmızıya geçiş pozitif reaksiyonu gösterir (Sandven, 1990).

2.4.4.4. Ticari Teşhis Yöntemleri

İdentifikasyonda kullanılan geleneksel testlerde uzman personele ihtiyaç bulunması nedeniyle, daha az uzman personel gerektiren daha spesifik ve sensitif testler geliştirilmiştir (Pincus ve ark., 2007).

Minyatürize biyokimyasal yöntemlerde, pleytlerde hazır bulunan çeşitli besi yerlerine saf kültürler inokule edilip inkübe edilir ve enzim-substrat ilişkisine göre oluşan renk değişimi ya da gaz oluşumu ile mikroorganizma identifiye edilir. Sonuçlar tanı çizelgeleri ile karşılaştırılabileceği gibi veri tabanlarıyla da analiz edilebilir. Bu sistemlerde kullanılan test kartları, değişik büyüklükte ve identifikasyon veya antibiyotik substratları içeren değişik sayıda mikro kuyucuklardan oluşmaktadır. Test kartlarının her bir gözünde farklı ayraçlar bulunmaktadır (Aras, 2011).

Yapılan çalışmalarda minyatür sistemlerin geleneksel yöntemlerden hız, doğruluk ve fiyat kriterleri açısından daha avantajlı olduklarını göstermektedir. Başlangıçta, hızlı tanı kitlerinin değerlendirilmesi gözle okunup daha sonra elde edilen manuel identifikasyon kodu kullanılarak mikroorganizma belirlenirken, günümüzde tanı şirketleri tarafından bilinmeyen kültürlerin identifikasyonlarının yapılabilmesi için bilgisayarlı otomatik okuyucular geliştirilmiştir (Aras, 2011).

Çeşitli biyokimyasal testleri içeren API 20C, API32C, API *Candida* veya RapID Yeast Plus System gibi ticari kitler *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan manuel, ID 32C, Vitek YBC, Vitek 2 ID-YST, BD Phoneix Yeast ID Panels gibi sistemler ise otomatik teşhis yöntemleridir (Freydiere ve ark., 2001; Pincus ve ark., 2007).

2.4.4.5. Serolojik Testler

Mantar enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Tanı için kullanılan testler arasında; immundifüzyon (ID), lateks aglütinasyon (LA), enzim immunassay (EIA), komplement fikzasyon (KF), enzyime-

linked immunosorbent assay (ELISA) ve radioimmünassay (RAI) testleri yer almaktadır. Serolojik testler fungal antijenlere karşı gelişen antikorları ve spesifik fungal antijenleri belirlemek amacıyla kullanılır (Winn ve ark., 2006). Bu antijenler; galaktomannan, (1-3)- β -D-glukan, mannan ve glukuronomannan'dır. Serolojik testler invaziv mantar enfeksiyonların tanısında birçok avantaj sağlamaktadır. Kültür için örnek alınmadığı veya kültürde üreme olmadığı durumlarda serolojik testlere başvurulmaktadır. Bununla birlikte, çalışılması riskli mantarların kültüre edilmesi serolojik testlerle ortadan kaldırılmaktadır (Birinci ve Tanrıverdi-Çaycı, 2016; Ener, 2011; Yeo ve Wong, 2002). Mantar enfeksiyonlarının erken teşhisinde antikor aranmasına dayalı serolojik testler, antikorların olmaması ya da gecikmiş antikor cevabı nedeniyle teşhiste tercih edilmemektedir. Antikordan ziyade antijen aranması, histoplazmozis, koksidioidomikozis, ve blastomikozisin erken teşhisinde büyük öneme sahiptir. Serolojik testlerle invaziv *Candida* enfeksiyonu bulunan hastaların %50'den fazlası yanlış negatif bulunmuştur. Sirküle olan *Candida* antijenlerinin direk teşhisi amacıyla testler standartize edilememiştir. Kriptokokal antikorların teşhisi ve kros reaksiyonlar nedeniyle serolojik testlerin kullanımı uygun değildir (Winn ve ark., 2006).

2.4.4.6. Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler metotlar mikroorganizmaya özgü bir genin nükleik asit sekansının teşhis edilmesi temeline dayanır. Mayaların taksonomisinin belirlenmesi ve patojen mayaların kısa sürede identifikasyonuna imkan sağlar. Spesifik mayanın identifikasyonu örnek, kültür, formalinle fikse edilmiş ya da parafinli dokulardan yapılabilir (Madhavan ve ark., 2011). İmmun sistemi baskılanmış kişilerde ciddi enfeksiyonlara sebep olan ve yeni tanımlanan (Kothavade ve ark., 2010; Sahiner ve ark., 2011) mayaların morfolojik olarak benzerliği, konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunun sınırlı olması yanlış identifikasyonlarına yol açmaktadır. Sekans analizleri fenotipik testlere göre mayaların tür ve cins seviyesinde daha objektif bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Son yıllarda PZR temeline dayalı RFLP-PZR, real-time PZR ve diğer PZR teknikleri teşhis için geliştirilmiştir (Hierro ve ark., 2004; Mirhendi ve ark., 2007). Maya genomlarında 18S, 5.8S ve 26S ribozomal RNA bölgeleri türler arasında ve türler içinde korunmuş bir bölge olup, çoklu kopyalar

halinde bulunur (Madhavan ve ark., 2011; Pincus ve ark., 2007). *Candida* türleri için rRNA'nın Internal Transcriber Spacer (ITS) bölgeleri tür identifikasyonunda önemlidir (Luo ve Mitchell, 2002). Moleküler yöntemler veteriner klinik örneklerinde *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılmasına karşın, rutin teşhislerde henüz kullanılmamaktadır (Quinn ve ark., 2011).

Son yıllarda matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) klinik örneklerden *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılmaktadır (Marklein ve ark., 2009). Ancak bu yöntem yeni ortaya çıkan mayaların identifikasyonunda hatalara neden olmaktadır (Westblade ve ark., 2013).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Maya Suşları

Çalışmada Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan (Wesel, Almanya) temin edilen *C. albicans* ATCC 90028 suşu izolasyon, identifikasyon ve PZR aşamalarında pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.2. Süt Örnekleri

Bu çalışma Ağustos 2017-Haziran 2018 tarihleri arasında yapıldı. Burdur ilinde süt sığırcı işletmelerine gidilerek, işletme sahiplerine mastitis problemi olup/olmadığı, yapılan tedaviler, kullanılan antibiyotikler, iyileşme olup/ olmadığı gibi soruları içeren bir anket çalışması yapıldı (Ek1). Mastitis problemi bulunan işletmeler, anket sonuçlarına göre çalışmaya dâhil edildi. İşletmelerde sürü büyüklüğü 13 ile 60 arasında değişmekteydi. Bu çalışmada toplam 20 işletmede bulunan 178 hayvandan 686 süt örneği usulüne uygun olarak toplandı. İşletmeler ve alınan süt örneklerinin sayısı tablo 3.1'de verildi. Bu araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Başkanlığının (MAKÜ-HADYEK/2017-315) onayı ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Süt örneklerinin alındığı işletmeler ve örnek sayıları.

Çiftlik No.	İlçe – Köy	Hayvan sayısı	Örnek Sayısı	Sürü Büyüklüğü
1	Kayaaltı Köyü / Burdur	7	27	45
2	Kayaaltı Köyü / Burdur	4	15	21
3	Kayaaltı Köyü / Burdur	7	27	30
4	Suludere Köyü / Burdur	10	38	27
5	Suludere Köyü / Burdur	10	40	24
6	Çine Köyü / Burdur	10	38	32
7	Kuruçay Köyü / Burdur	9	35	17
8	Düğer Köyü / Burdur	11	42	55
9	Taşkapı Köyü / Burdur	11	44	40
10	Taşkapı Köyü / Burdur	8	30	20
11	Ardıçlı Köyü / Burdur	7	26	30
12	Askeriye Köyü / Burdur	6	22	23
13	Akyaka Köyü / Burdur	10	38	48
14	Merkez / Burdur	10	40	13
15	Yazıköy Köyü / Burdur	10	39	32
16	Yazıköy Köyü / Burdur	10	36	35
17	Yazıköy Köyü / Burdur	9	35	60
18	Yazıköy Köyü / Burdur	11	42	33
19	Yazıköy Köyü / Burdur	8	32	25
20	Kemer / Burdur	10	40	59
Toplam		178	686	669

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Kanlı Agar (Merck, Almanya)

Nutrient substrat (kalp ekstraktı ve peptonlar).....	20 gr
Sodyum klorit.....	5 gr
Agar.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml
Koyun kanı.....	%5-10

Distile suya ilave edilen içerik eritildikten sonra pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı ve 121°C 'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri 50°C 'ye soğutulduktan sonra %5-10 defibrine koyun kanı ilave edildi ve steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Kloramfenikol Suplementi ilave edilmiş Sabourraud Dekstroz Agar (SDA)

Sabourraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck, Almanya)

Pepton (et).....	5 gr
Pepton (kazein).....	5 gr
D(+) Glukoz.....	40 gr
Agar.....	15 gr
Distile su.....	1000 ml

Kloramfenikol Suplementi'nin Hazırlanması (Oxoid, UK)

Supplement, 50 mg kloramfenikol içeren şişeye 3 ml etanol ilave edilerek hazırlandı. Bir şişe supplement 500 ml besiyerine ilave edildi.

Distile suya ilave edilen içerik eritildikten sonra pH $5,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı ve 121°C 'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra kloramfenikol supplementi ilave edildi ve steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Tween 80'li Mısır Unu Besiyeri (Oxoid, UK)

Mısır unu ekstraktı.....	2 gr
Agar.....	15 gr
Tween 80 (Merck, Almanya).....	.%1
Distile su.....	1000 ml

Distile suya ilave edilen içerik eritildikten sonra pH $6,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı ve 121°C 'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

CHROMagar™ Candida Besiyeri (CHROMagar Microbiology, Fransa)

Agar.....	15 g
Pepton.....	10,2 g
Kloramfenikol.....	0,5 g
Kromejenik karışım.....	22 g
Distile su.....	1000 ml

Distile suya ilave edilen içerik 100°C 'ye kadar karıştırılarak kaynatıldı ve pH $6,1 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan steril petrilere 25-30 ml dağıtıldı.

Triptik Soya Buyyon (TSB) (Oxoid, UK)

Tripton.....	17 g
--------------	------

Soya peptonu.....	3 g
Sodyum klorid.....	5 g
Dipotasyum hidrojen fosfat.....	2,5 g
Dekstroz.....	2,5 g
Distile su	1000 ml

Distile suya ilave edilen içerik eritildikten sonra pH $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı ve 121°C 'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra steril tüplere 10-15 ml dağıtıldı.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Elektroforez Jel Tankı

DNA'nın agaroz jelde elektrik akımı yardımı ile yürütülmesini sağlamak için kullanıldı (Serva, BM100, İngiltere).

ELİZA Okuyucu

Mikropleylerde uygulanan biyofilm testinde optik dansiteyi ölçmek amacıyla kullanıldı (Rayto, RT-2100C, Almanya).

Etüv

Maya izolatlarının izolasyon ve identifikasyonları esnasında üremeleri için gerekli ortamı sağlamak için kullanıldı (Mermert, Almanya)

Görüntüleme Cihazı

Jelde yürütülen DNA fragmentlerinin UV ışığı altında görüntülenmesi için kullanıldı (EDAS 290, Kodak, ABD).

Güç Kaynağı

Elektroforez jel tankında DNA gagmentlerinin yürütülmesi için gerekli elektrik akımını sağlamak için kullanıldı (Teko, İtalya).

Fotoğraf Makinası

Görüntüleme cihazı ile görüntülenen ürünlerin fotoğraflanması ve bilgisayara aktarılması için kullanıldı (Digital Graphic Printer, Kodak, ABD).

Isı Döngü Cihazı (Thermal Cycler)

Genomik DNA'nın istenen bölgesinin çoğaltılması için kullanıldı (Nyx Teknik, A6-00150, ABD).

Jel Elektroforez Ünitesinin Tarakları

Jel üzerinde 1-2 mm kalınlık ve 7 µl hacimde 16 adet kuyucuk açan 2 adet tarak (Scie-plas, HU10, İngiltere).

Manyetik Karıştırıcı

Besiyerlerinin hazırlanması sırasında karıştırmak için kullanıldı (Isolab, Almanya).

Mikrodalga Fırın

Agarozun TAE içerisinde eritilmesi sırasında gerekli ısıyı sağlamak için kullanıldı (Beko, Türkiye).

Otoklav

Besiyerlerinin ve cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanıldı (Hirayama, Japonya).

Otomatik pipetler

0,5-10 µl, 2-120 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl'lik otomatik pipetler kullanıldı (Thermo Scientific, Finlandiya)

PZR Kabini

PZR uygulamalarının steril bir ortamda yapılması için kullanıldı (Biosan, Riga, Letonya)

Santrifüj

Süspansiyon halindeki katı maddelerin içinde bulunduğu sıvıdan merkez kaç kuvveti ile ayrılması için kullanıldı (Hermle Z 233 M-2, Almanya).

Tartım Cihazı

Besiyerleri, agaroz ve kimyasal maddelerin hazırlanması için kullanıldı (Sartorius, Almanya).

Vorteks

Süspansiyonları karıştırmak için kullanıldı (MS1 Minishaker, IKA, ABD).

Primerler

C. albicans'ın doğrulanması ve virülens faktörlerinin gösterilmesi için kullanıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. *C. albicans* ve virülens faktörlerini kodlayan genler, primer dizisi ve PZR ürünleri.

Hedef gen	Primer dizisi	PZR ürünü (bp)
CALB1	Forward 5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3' Reverse 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'	273 bp
PLB1	Forward 5'-ATGATTTTGCATCATTTG-3' Reverse 5'-AGTATCTGGAGCTCTACC-3'	751 bp
ALS1	Forward 5'-GACTAGTGAACCAACAAATACCAGA-3' Reverse 5'-CCAGAAGAAACAGCAGGTGA-3'	318 bp

bp: baz çifti

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Tampon Solüsyonlar

Agaroz

DNA fragmentlerinin yürütülmesi için lineer bir polimer olan agaroz (Sigma-Aldrich Low EEO, 9012-36-6, ABD) kullanıldı. Agaroz %1,5 olacak şekilde distile su içinde hazırlandı.

Elektroforez Tamponu

DNA'nın jel ortamında hareket etmesi için 10xTAE (Thermo Scientific, ABD) buffer kullanıldı.

Maya Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti

Maya kolonilerinden genomik DNA ekstraksiyonu için ticari bir kit (Yeast DNA Preparation Kit, Jena Bioscience, Almanya) kullanıldı.

Marker

Elektroforezde yürütülen DNA'ların büyüklüğünü ölçmek için 100 bp'lık marker kullanıldı (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, ABD).

PZR Master Mix

Polimerizasyon reaksiyonu için içerisinde dNTP ve ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz içeren karışım kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

Yükleme Solüsyonu

DNA örneğinin jelde yürütmesi için kullanıldı (Vivantis, Malezya).

Ethidium Bromid

Elektroforez aşamasında DNA ile karıştırılarak UV altında görüntülenmesi için kullanıldı (Thermo Scientific, ABD).

3.2. Yöntem

3.2.1. Süt Örneklerinin Toplanması

Mastitisli sığırların bulunduğu işletmelerdeki hayvanlardan süt örnekleri toplandı. Süt örneği almadan önce meme uçları temizlenip %70 alkolle silindi, birkaç damla sağılıp atıldıktan sonra meme loblarının her birinden ayrı steril tüpler içine direk 10 ml. süt sağıldı. Tüplerin üzerine ineğe ve memeye bilgiler yazıldı. Süt örnekleri soğuk zincir altında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

3.2.2. *Candida albicans* İzolatlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu

Süt örnekleri mikolojik kültür amacıyla %5 koyun kanı içeren kanlı agar (Merck, Almanya) ve kloramfenikol supplementi (Oxoid, UK) ilave edilmiş

Sabouraud Dextroz agar (SDA)'a (Merck, Almanya) ekildi Petriler aerobik ortamda 37°C'de 24-72 saat inkübe edildi. İzole edilen mayalar Gram boyama, germ tüpü, klamidospor oluşumu, 45°C'de ve kromojenik besiyerinde üreme gibi konvansiyonel yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlandı (Quinn ve ark., 2011, Arda 2015).

3.2.2.1. Germ Tüp Testi

C. albicans izolatlarının (tek düşecek şekilde) supplement ilave edilmiş SDA'ya pasajları yapıldı. Steril tüpler içine 1 ml serum dağıtıldı. Öze ile 1 maya kolonisinden alınarak, serum içeren tüplerde koloniler süspanse edildi. Daha sonra 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bu süspansiyondan bir damla alınarak, lam-lamel arası preparat hazırlandı ve 40'luk (40x) büyütmede ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) incelendi. Maya hücresinden çıkan ve maya hücresinin 3-4 katı uzunluğunda olan, başlangıç noktasında boğumlanma olmayan, uzunluğu boyunca kabarıklık göstermeyen, filament şeklinde uzantılar görülen mayalar germ tüpü pozitif olarak değerlendirildi (Quinn ve ark., 2011). Germ tüpü oluşumu kontrol suşu olan *C. albicans* ATCC 90028 suşu ile karşılaştırıldı. Germ tüpü pozitif maya izolatları *C. albicans* olarak identifiye edildi.

3.2.2.2. Klamidospor Oluşumu

Klamidospor oluşumu Tween 80 (Merck, Merck Millipore Corporation, Almanya) ilave edilmiş mısır unu besiyerinde (Oxoid, Hamshire, UK) yapıldı. Buna göre; maya izolatlarının klamidospor geliştirmesini artırmak amacıyla öze ile maya kolonisinden alınarak, yaklaşık 30 derecelik açıyla besiyeri bir noktadan delindi ve besiyerinin tabanına bastırarak bir çizgi şeklinde ileri itilerek geri çekildi. Ekim çizgilerinin üzerine lamel kapatılarak 26 °C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda petriler ışık mikroskopunda diyafram kapalı olarak 10x, 20x ve 40x büyütmede incelendi. Pseudohifaların uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidosporlar ile hifa birleşim yerlerindeki blastospor kümelerinin görülmesi *C. albicans* pozitif olarak değerlendirildi (Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999)

3.2.2.3. Kromojenik Besiyerinde Üreme

Maya izolatları, *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan CHROMagar *Candida* besiyeri ne ekildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. *C. albicans* olarak identifiye edilen izolatların besiyerinde mavi-yeşil koloniler oluşturdukları belirlendi (Marinho ve ark., 2010).

3.2.6. 45°C'de Üreme

C. albicans ve *C. dubliniensis* ayırımını yapmak için maya izolatları supplement ilave edilmiş SDA'ya ekildi ve 45°C'de 10 gün inkübasyona bırakıldı. Üreme saptanan *Candida* izolatları, *C. albicans* olarak identifiye edildi (Marinho ve ark., 2010).

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Maya izolatlarından DNA ekstraksiyonu, ticari bir maya DNA ekstraksiyon kiti (Yeast DNA Preparation Kit, Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak yapıldı. DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce, kit içinden çıkan proteinaz K, lyticase, RNase A ve yıkama bufferları kit prosedürüne göre hazırlandı. Kit prosedürüne göre; maya izolatlarının her birinden bir koloni alınarak TSB besiyerinde bir gecelik kültürü yapıldı. Kültürden 500µl alındı ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve üzerine 100 µl resüspanسیون buffer ve 1 µl lyticase ilave edildi ve 10 saniye vorteksle karıştırıldı. Daha sonra 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve üzerine 300 µl lysis buffer ve 2 µl RNase A ilave edildikten sonra 10 saniye karıştırıldı. Daha sonra 8 µl proteinaz K eklendi, 60°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika soğutuldu. Süre sonunda üzerine 300 µl binding buffer eklendi, vorteksle karıştırıldı ve 5 dakika buz içindeki tüpe yerleştirildi. Daha sonra 10000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu arada spin column yerleştirilmiş ependorf tüp içine 100 µl activation buffer eklendi ve 10000 g de 30 saniye santrifüj edildi ve

sıvı kısım atıldı. Süpernatant spin column içine pipetle eklendi ve 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra 500 µl washing buffer spin columnna ilave edildi ve tekrar 10000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra 2 ml'lik yıkama tüpü atıldı ve column elution tüpe yerleştirildi. 40-50 µl elution buffer column merkezine eklendi ve oda ısısında 1 dakika inkübe edilmesinin ardından 10000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.3.2. *C. albicans*'ın PZR ile Doğrulanması

PZR ile *C. albicans*'ın ITS bölgesi için spesifik gen bölgesini kodlayan CALB1 primerleri BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) araştırması ile belirlendi. *C. albicans*'a spesifik bu gen bölgesinin amplifikasyonu 25 µl PZR reaksiyon karışımında (12,5 µl PZR master mix (2X)(Thermo Fisher Scientific,Inc, ABD), 1 µl herbir primerden (10 µM), 5 µl DNA) yapıldı. Amplifikasyon işlemi 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, 35 siklus (94°C'de 1 dakika, 52°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika) sonrası 72°C'de 5 dakika zincir uzaması şeklinde ısı döngü cihazında (Nyx Teknik, A6-00150, ABD) uygulandı (Mannarelli ve Kurtzman, 1998). PZR ürünleri %1,5 agaroz jel içeren TAE (Thermo Scientific, ABD)'de etidyum bromid ile boyanarak yürütüldü ve 273 bp'da oluşan bantların ait olduğu izolatlar *C. albicans* pozitif olarak değerlendirildi (Susever ve Yeğenoğlu, 2012). Pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu, negatif kontrol olarak steril bidistile su kullanıldı.

3.2.3.3. *C. albicans*'ın Virülens Genlerinin Saptanması

PLB1 geni için Mukherjee ve ark. (2001) tarafından daha önce bildirilen primerler sentezletirildi. Amplifikasyon; 25 µl hacimde (5 µl DNA, 12,5 µl 2X master mix, 1µl primer F (10 µM) ve primer R (10 µM) hazırlandı. Amplifikasyon, ısı döngü cihazında 94°C'de 5 dakika, bunu takiben 94°C'de 1 dakika, 47°C'de 1 ve 72°C'de 1 dakika 35 siklus ve son olarak 72°C'de 5 dakika uygulandı (Eldesouky ve ark., 2016). PZR ürünleri, %1,5 agarose-jelde etidyum bromidle boyanarak

yürütüldü. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu, negatif kontrol olarak steril bidistile su kullanıldı.

ALSI geni için amplifikasyon: 25 µl hacimde (5 µl DNA, 12,5 µl 2X master mix, 1µl primer F (10 µM) ve primer R (10 µM) hazırlandı. Amplifikasyon, 94°C'de 4 dakika, bunu takiben 94°C'de 30 saniye, 52°C'de 1 dakika ve 72°C'de 2 dakika 35 siklus ve son olarak 72°C'de 5 dakika uygulandı (İnci ve ark., 2013). PZR ürünleri, %1,5 agarose-jelde etidyum bromidle boyanarak yürütüldü. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu, negatif kontrol olarak steril bidistile su kullanıldı.

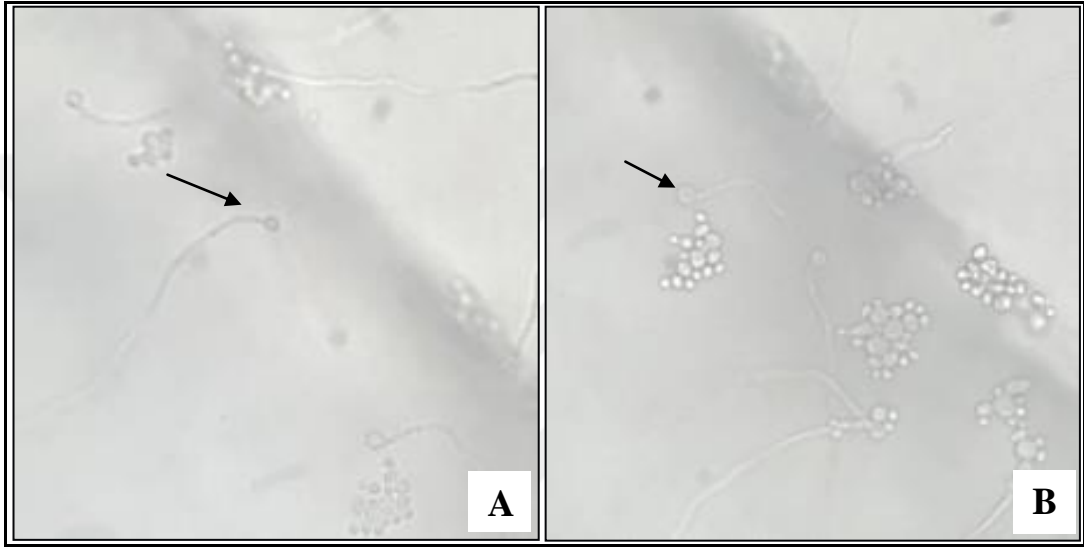
3.2.4. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu Christensen ve ark. (1995)'nin tanımladığı modifiye Christensen (tüp adherens) yöntemine göre yapıldı. Buna göre; son konsantrasyonu %2 glukoz olacak şekilde hazırlanmış steril TSB besiyeri 5 ml olacak şekilde steril, U tüplere dağıtıldı. Maya kolonisinden alınarak, bu besiyeri içine ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda, tüp içeriği dezenfektan bulunan kavanoz içine boşaltıldı ve 3 kez PBS (pH 7,2) ile yıkandı. Tüplerin içine 5 ml %1'lik kristal viyole ilave edildi ve 3 saat bekletildi. Sonrasında boya döküldü ve tüpler ters çevrilerek kurumaları beklendi. Tüplerin iç cidarında renkli tabaka varlığı pozitif olarak değerlendirildi. Rengin koyuluk ve kalınlığına göre biyofilm oluşumu “güçlü pozitif”, “pozitif”, “zayıf pozitif” olarak değerlendirildi. Renk değişikliği olmayan tüpler ve sıvının hava ile temas ettiği bölgede gözlenen boya kalıntıları negatif olarak değerlendirildi. Tüp içinde şekillenen renkli tabakayı doğru değerlendirmek için test 3 kez tekrarlandı.

4. BULGULAR

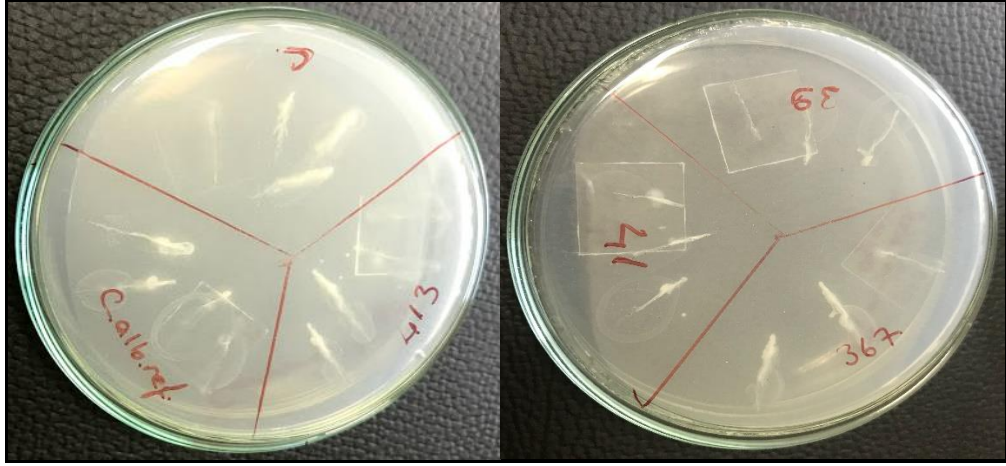
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Süt örneklerinden 49 (%7,14) maya izole edildi. Maya izolatlarının 5 (%10,20)'inde germ tüp oluşumu belirlendi ve bu izolatlar *C. albicans* olarak tanımlandı (Şekil 4.1).

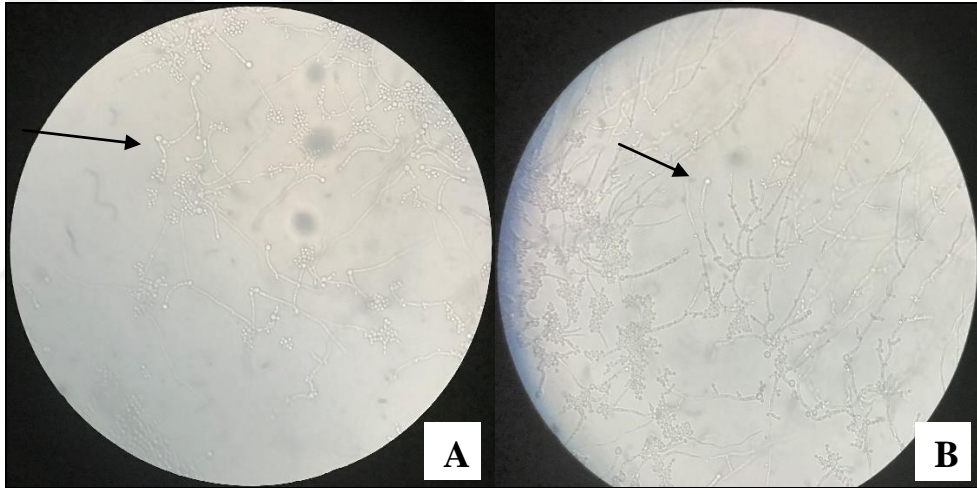


Şekil 4.1. *C. albicans* izolatlarında germ tüp oluşumu (A-*C. albicans* ATCC 90028 B-*C. albicans* izolatı).

İzole edilen tüm maya izolatlarında ve *C. albicans* kontrol suşunda Tween 80 ilave edilmiş mısır unlu besiyerinde klamidospore oluşumu araştırıldı (Şekil 4.2). Germ tüp oluşturan 5 *C. albicans* izolatının aynı zamanda klamidospore oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.3).

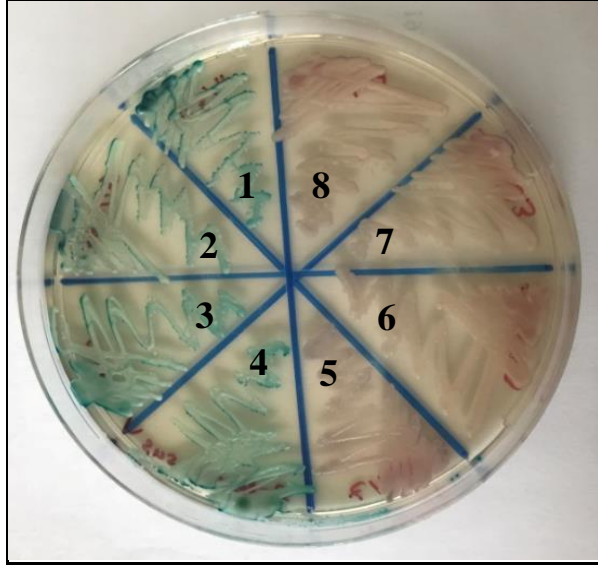


Şekil 4.2. Tween 80'li Mısır unu besiyerinde *Candida* izolatlarının görüntüsü.



Şekil 4.3. Klamidosporların mikroskopta görünümü (A-*C. albicans* ATCC 90028, B-*C. albicans* izolatı).

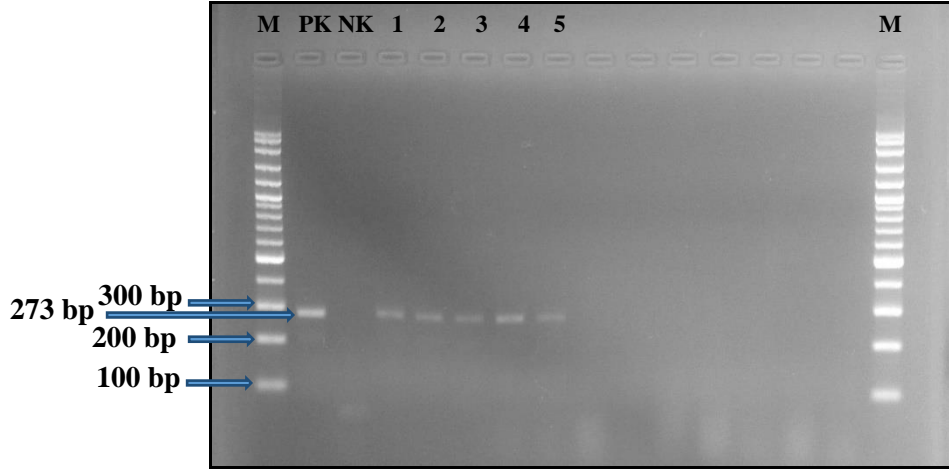
C. albicans olarak tanımlanan tüm izolatların kromojenik besiyerinde mavi-yeşil renk oluşturduğu gözlemlenirken, diğer maya izolatlarının pembe renkte koloniler oluşturduğu belirlendi (Şekil 4.4). Germ tüpü ve klamidospor oluşturan, kromojenik besiyerinde mavi-yeşil koloni oluşturan *C. albicans* izolatlarının 45°C'de ürettiği gözlemlendi.



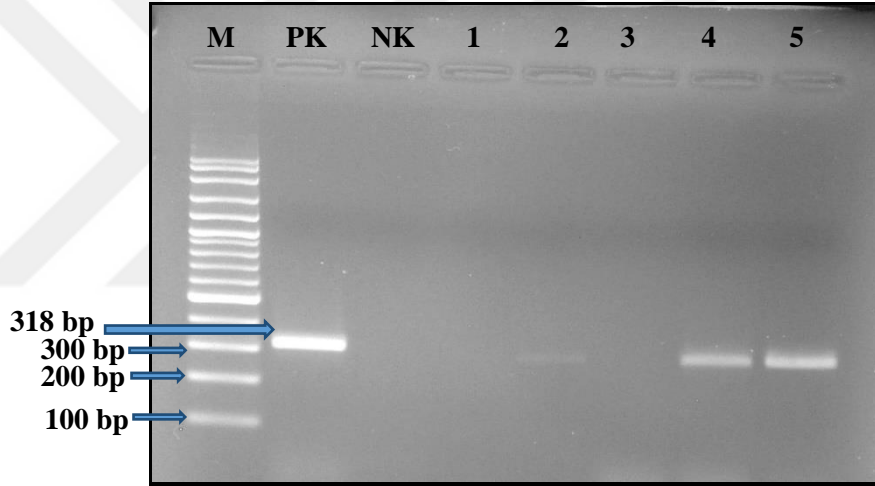
Şekil 4.4. Kromojenik besiyerinde *Candida* kolonileri (1: pozitif kontrol *C. albicans* ATCC 90028, 2-4: *C. albicans* izolatları, 5-8: diğer maya izolatları).

4.2. PZR Bulguları

Bu çalışmada, izole edilen tüm maya izolatlarına PZR uygulandı. Mastitisli sütlerden izole edilen tüm maya izolatlarının sadece 5 (%10,20)'inde ve pozitif kontrol suşunda (*C. albicans* ATCC 90028) *C. albicans*'a spesifik ITS bölgesini kodlayan gen (CALB1) varlığı saptandı (Şekil 4.5). Bu izolatların fenotipik özelliklerine göre *C. albicans* olarak tanımlanan maya izolatları olduğu belirlendi. İzole edilen tüm maya izolatlarında, *ALS1* gen varlığı spesifik primer kullanılarak araştırıldı. Sadece *C. albicans* olarak tanımlanan izolatların 3 (%60)'ünde *ALS1* geninin bulunduğu, 2 (%40) izolatın ise *ALS1* geni taşımadığı saptandı (Şekil 4.6).

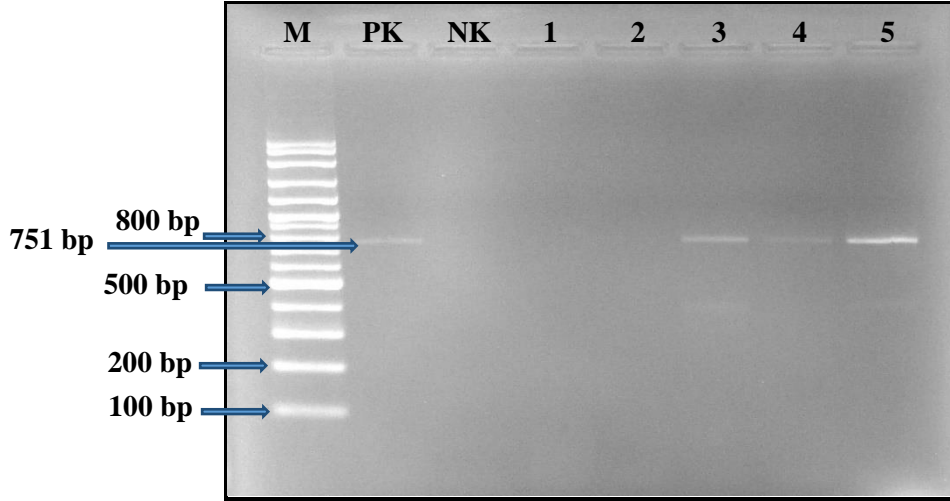


Şekil 4.5. *C. albicans* izolatlarında CALB1 gen varlığı [M: marker (100 bp); PK: pozitif kontrol, *C. albicans* 90028 suşu; NK: negatif kontrol, distile su; 1-5: *C. albicans* izolatları].



Şekil 4.6. *C. albicans* izolatlarında ALS1 gen varlığı [M: Marker (100 bp); PK: Pozitif kontrol, *C. albicans* 90028 suşu; NK: Negatif kontrol, distile su; 1,3: ALS1 negatif *C. albicans* izolatları; 2, 4-5: ALS1 pozitif *C. albicans* izolatları].

Tüm maya izolatlarında *PLB1* gen varlığı araştırıldı. Fenotipik özelliklerine göre *C. albicans* olduğu belirlenen ve PZR ile de doğrulanan izolatların 3 (%60)'ünün *PLB1* geni için 751 bp'lik bant oluşturduğu saptandı (Şekil 4.7). İzolatların 2 (%40)'sinde bu gen tespit edilmedi.



Şekil 4.7. *C. albicans* izolatlarında *PLB1* gen varlığı [M: Marker (100 bp); PK: Pozitif kontrol, *C. albicans* 90028 suşu; NK: Negatif kontrol, distile su; 1-2: *PLB1* negatif *C. albicans* izolatları, 3-5: *PLB1* pozitif *C. albicans* izolatları].

PLB1 geni taşıyan 1 (%20) izolatın *ALS1* genini taşımadığı, *PLB1* genine sahip olmayan 1 (%20) *C. albicans* izolatının da *ALS1* genine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *C. albicans* izolatlarında PZR ile *CALB1*, *PLB1* ve *ALS1* gen varlığının tespit edilmesi.

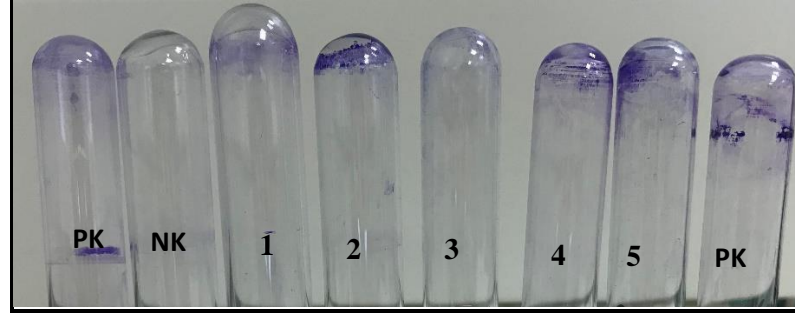
<i>C. albicans</i> izolatları	<i>CALB1</i>	<i>PLB1</i>	<i>ALS1</i>
1	+	-	-
2	+	-	+
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
Toplam	5 (%100)	3 (%60)	3 (%60)

+: pozitif, -: negatif sonuçları ifade eder.

4.3. Biyofilm Bulguları

C. albicans izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri tüp adherens yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.8) Pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu, negatif kontrol olarak steril TSB besiyeri kullanıldı. Mastitisli sütlerden izole edilen 5 *C.*

albicans izolatlarının 1 (%20)'inde (4 numaralı izolat) biyofilm oluşmadığı, 1 (%20)'inde (1 numaralı izolat) ise zayıf oluştuğu görüldü. İzolatların 3 (%60)'ünde (2, 4, 5) ise biyofilm oluşumu güçlü pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.8. *C. albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin tüpte gösterilmesi (PK: pozitif kontrol; NK: negatif kontrol; 2-4-5: +++, 1: +; 3: -).

Bu çalışmada elde edilen *C. albicans* izolatlarının virülens faktörleri toplu olarak tablo 4.2'de verildi. Buna göre 3 (%60) izolatta *ALS1* ve *PLB1* genleri varlığı saptanırken, biyofilm oluşumu tüp adherens yöntemi ile 4 (%80)'ünde tespit edildi.

Tablo 4.2. *C. albicans* izolatlarında virülens faktörleri.

<i>C. albicans</i> İzolatları	Virülens Faktörleri		
	<i>ALS1</i>	<i>PLB1</i>	Biyofilm
1	-	-	+
2	-	+	+
3	+	-	+
4	+	+	-
5	+	+	+
Toplam	3 (%60)	3 (%60)	4 (%80)

+: pozitif, - :negatif sonuçları ifade eder.

5. TARTIŞMA

Sığır mastitisi tüm dünyada görülen süt veriminin azalması, süt kalitesinin bozulması, antibiyotik ve veteriner hekim masrafları gibi nedenlerle ciddi ekonomik zararlara yol açan bir hastalıktır (Aydın ve ark., 2006). Mastitisin etiyojisinde birçok faktör bildirilmekle birlikte bakteri, virüs ve mayalar mastitise yol açmaktadır (Costa ve ark., 1993; Dworecka-Kaszak ve ark., 2012; Krukowski ve ark., 2000; Santos ve Marin, 2005; Şeker, 2010). Mayaların neden olduğu mastitisin prevalansı, diğer etiyojik ajanlarla karşılaştırıldığında genellikle düşüktür (Czernomysy-Furowicz ve ark., 2008; Santos ve Marin, 2005; Wawron ve ark., 2010). Mayalar sığırların doğal çevrelerinde ve deri, meme başı gibi bölgelerinde flora üyesi olarak bulunurlar (Costa ve ark., 2012; Santos ve Marin, 2005). Kontamine sütün elle veya makine ile sağılması, hayvan sahipleri ve veteriner hekimler tarafından gelişigüzel ve sık antibiyotik kullanımı, kontamine antibiyotik preparatları, kanül ve enjektörlerin meme içi kullanımı sığırlarda maya enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Costa ve ark., 2012; Dworecka-Kaszak ve ark., 2012). Mikotik mastitis vakalarından *Candida* türleri özellikle de *C. albicans* sıklıkla izole edilmektedir (Krukowski ve ark., 2000; Şeker, 2010; Tarfarosh ve Purohit, 2008; Türkyılmaz ve Kaynarca, 2010; Wawron ve ark., 2010).

C. albicans hem mastitisli sütlerden hem de sağlıklı sütlerden izole edilebilmektedir (Krukowski ve ark., 2010; Sartori ve ark., 2014; Şeker, 2010; Tarfarosh ve Purohit, 2008; Türkyılmaz ve Kaynarca, 2010). Tarfarosh ve Purohit (2008) Hindistan'da klinik mastitisli ineklerin %7,14 (56/4)'ünden *Candida* izole edildiğini bildirmişlerdir. Krukowski ve ark. (2000) ise Polonya'nın Lublin bölgesinde 604 süt örneğinin %64,57'sinden çeşitli bakterilerin ve %9,6'sından maya izole edildiğini, izole edilen mayaların %82,76'sının *Candida* spp. ve %5,17 (3/58)'sinin *C. albicans* olduğunu bildirmişlerdir. Sartori ve ark. (2014) Brezilya'da mastitisli ineklerden topladıkları süt örneklerinin %12,8'inden *Candida* izole edildiğini, en fazla *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* izolasyonu yapıldığını, *C. albicans*'ın %12,8 oranında izole edildiğini bildirmişlerdir. Santos ve Marin (2005) 260 süt örneğinden %17,3 *Candida* spp. izolasyonu yapıldığını, *C. krusei* (%44,5) ve *C. rugosa* (%24,5)'nin en fazla izole edilen tür olduğunu, *C. albicans*'ın

ise izolasyon oranının %8,9 olduğunu rapor etmişlerdir. Costa ve ark. (2012) Brezilya'da bir işletmede çıkan mastitis probleminde, ineklerden alınan 106 süt örneğinin %43,48'inden *Corynebacterium* spp., %29,35'inden *Candida* spp. izole edildiğini, bu izolatların %33,34'ünün *C. albicans*, %22,23'ünün *C. catenulata* ve %18,52'sinin *C. glabrata* olduğunu, diğer *Candida* türlerinin de izole edildiğini bildirmişlerdir. Wawron ve ark. (2010) 2122 süt örneğinin %83,36'sından bakteri, %7,07'sinden maya izole edildiğini, bu mayaların %1,33'ünün *C. albicans* olduğunu bildirmişlerdir.

Şeker (2010) Türkiye'de Afyon ilinde yaptığı çalışmada klinik ve subklinik mastitisli ineklere ait sütlerden %12,77 *Candida* spp. izole edildiğini, %10,14'ünün *C. albicans* olduğunu rapor etmiştir. Türkyılmaz ve Kaynarca (2010) Aydın ilinde subklinik mastitisli hayvanlardan toplanan 339 süt örneğinin 297'sinden aerobik mikroorganizmaların izole edildiğini, %10'unun *Candida* spp. olduğunu, *C. albicans*'ın izole edilemediğini bildirmişlerdir. Erbaş ve ark. (2017) 260 mastitisli süt örneğinin %17,7'sinden *Candida* spp. izole edildiğini, en fazla *C. tropicalis* ve *C. parasilosis*'in identifiye edildiğini, *C. albicans*'ın ise izole edilmediğini rapor etmişlerdir.

Sunulan bu çalışmada mastitis problemi bulunan 20 işletmeden toplanan 686 süt örneğinden %7,14 (49/686) maya izolasyonu yapıldı. Maya izolatlarının %10,20'si *C. albicans* olarak identifiye edildi. Bu oran yapılan çalışmalarda (Costa ve ark., 2012; Krukowski ve ark., 2000; Sartori ve ark., 2014; Şeker 2010; Tarfarosh ve Purohit, 2008; Türkyılmaz ve Kaynarca, 2010; Wawron ve ark., 2010) izole edilen *Candida* spp. ve *C. albicans* oranlarına benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar (Costa ve ark., 1993; Eldesouky ve ark., 2016; Erbaş ve ark., 2017; Krukowski ve ark., 2000; Mousa ve ark., 2016; Santos ve Marin, 2005) *Candida* türlerinin neden olduğu mikotik mastitis prevalansının %17,7-79,4 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ülkelere ve işletmelere göre mikotik mastitis prevalansında farklılıklar dikkat çekmektedir. *Candida* türleri özellikle de *C. albicans* insan ve hayvanların yaşadıkları çevrede, deri, sindirim ve genital sistemlerinde flora etkeni olarak bulunmaktadır (Santos ve Marin, 2005). Ancak hayvanların doğal savunma sisteminde zayıflama olduğunda veya işletmede hijyen

şartlarına dikkat edilmediğinde mayalar meme bezlerine ulaşarak enfeksiyona yol açabilirler. *Candida* mastitislerinin prevalansında ülkelere ve işletmelere göre farklılık göstermesi işletmelerde hijyene dikkat edilmemesinden kaynaklanabilir. Bununla birlikte işletmelerde kontamine antibiyotik preparatları, kanül ve enjektör uygulamaları, mastitis vakalarında antibiyotik direncine bağlı olarak uzun süre antibiyotiklerin kullanımı *Candida* mastitislerine yol açabilir. Bu çalışmada esas hedef izole edilen *C. albicans* izolatlarında virülens faktörlerinin gösterilmesi olduğundan, *C. albicans* dışındaki mayaların ve bakterilerin identifikasyonuna gidilmemiştir.

C. albicans'ın ön teşhisi sıklıkla germ tüp testi ile yapılmaktadır (Madhavan ve ark., 2011; Quinn ve ark., 2011). *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden ayırımında en hızlı, en basit ve ucuz test olan germ tüp testi, altın standarttır (Byadarally-Raju ve Rajappa, 2011). Deorukhkar ve Roushani (2018) klinik örneklerden izole edilen germ tüp testi pozitif *Candida* izolatlarının %90'ının *C. albicans* olarak identifiye edildiğini bildirmişlerdir. Ancak yapılan çalışmalar (Er ve ark., 2015; Mackenzie, 1962; Mehta ve ark., 2018) germ tüp testinin farklı besiyerleri, ısı ve sürede yapıldığında farklı sonuçlar alındığını göstermiştir. Mehta ve ark. (2018) insan serumu ile yapılan germ tüp testinin %94,53 sensitifiteye sahip olduğunu bildirmiştir. *C. albicans* germ tüpü oluşturması ile diğer *Candida* türlerinden ayrılır. Buna karşın, bazı araştırmacılar (Kadry ve ark., 2018; Lipperheide ve ark., 1993; Mackenzie, 1962) *C. albicans* izolatlarının %5-10'unun germ tüp oluşturmadığını bildirilmiştir. *C. dubliniensis* germ tüp testi ve klamidospore oluşumu gibi birçok fenotipik özelliği ile *C. albicans*'a benzerlik gösteren, diğer bir *Candida* türüdür (Kadry ve ark., 2018; Sampath ve ark., 2017). Bu çalışmada germ tüp testi insan serumu ile yapıldı ve maya izolatlarının 5'i germ tüp testinde pozitif bulundu ve *C. albicans* olarak identifiye edildi. *C. albicans* dışındaki diğer maya izolatlarından bazılarının germ tüp benzeri yapılar oluşturduğu, hifanın ana hücreden çıktığı yerde bir boğum şekillendiği gözlemlendi. *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'in germ tüp benzeri hifalar oluşturabileceği, bu hifaların, ana hücreden uzandığı bölgede daralma göstermesinin *C. albicans*'la ayırımında önemli olduğu araştırmacılar (Yücel ve Kantarcıoğlu, 1999) tarafından bildirilmiştir. Bu nedenle

hifanın ana hücreden çıktığı yerde boğumlanma gösteren izolatlar *C. albicans* olarak değerlendirilmedi.

C. albicans'ın identifikasyonunda germ tüp testi belirlenen izolatlarda klamidospore oluşturma özelliği Tween 80 ilave edilmiş veya edilmemiş mısır unu, pirinç unu gibi besiyerlerinde araştırılmaktadır (Pincus ve ark., 2007). Bazı araştırmacılar (Deorukhkar ve Roushani, 2018; Kirckpatrick ve ark., 1998; Kurzai ve ark., 2000) klamidospore oluşturma özelliğinin *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarında farklılık gösterebileceğini bu nedenle bu iki türün ayırımında ek testlere ihtiyaç duyulabileceğini bildirmişlerdir. *C. albicans* yalancı hifa üzerinde bir klamidospore oluştururken, *C. dubliniensis* ikili, üçlü hatta daha fazla klamidospore oluşturabilir (Seyer ve ark., 2009). Bu çalışmada izolatların tümü Tween 80 ilave edilmiş mısır unu besiyerine ekildi ve germ tüp testinde *C. albicans* olarak tanımlanan izolatların hifalar üzerinde bir klamidospore oluşturduğu, diğer izolatların ise klamidospore oluşturmadığı gözlemlendi. Sunulan çalışmada hifalar üzerinde bir klamidospore görülmesine rağmen, *C. albicans* izolatlarının *C. dubliniensis*'den ayırımı amacıyla 45°C'de ve kromojenik besiyerinde üreme özellikleri araştırıldı. *C. albicans* olarak tanımlanan izolatlar 45°C'de üremesine karşın, diğer maya izolatlarının bu yüksek ısıda üremediği görüldü. Bu bulgular, bu iki mayanın ayırımının 45°C'de üreme özelliği ile yapılabileceğini söyleyen araştırmacıları (Pinjon ve ark., 1998; Sullivan ve ark., 1995; Şahiner ve ark., 2011) desteklemektedir. Ancak bazı araştırmacılar (Kirckpatrick ve ark., 1998; Kurzai ve ark., 2000) bazı *C. albicans* izolatlarının da bu yüksek ısıda ürememediğini bildirmişlerdir.

Mayaları hızlı bir şekilde tanımlamak amacıyla kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri klinik olarak önemli *Candida* türlerinin hızlı ve etkili bir şekilde identifikasyonunu sağlar (Çiçek ve ark., 2014; Pincus ve ark., 2007). İçlerinde türe özgü kromojenik substratlar bulunduran bu besiyerlerinde, substratlar ile mayaların ürettiği enzimler reaksiyona girerek değişik renklerde koloniler oluştururlar. Üretici firma farklılığına bağlı olarak kromojenik besiyerlerinin spesifikite ve sensitivitesi, tanımlanan *Candida* türleri farklılık gösterebilmektedir (Gültekin ve ark., 2013). *C. albicans*'ın identifikasyonuna yönelik

kullanılan kromojenik besiyerleri *C. albicans*'ın β -galaktosaminidaz enzim aktivitesini ortaya koymaya yöneliktir (Pincus ve ark., 2007). *C. albicans* ve *C. dubliniensis* birbirine yakın renkte koloniler oluşturduğundan kromojenik besiyerlerinde ayırt edilemezler (Feyzioğlu ve ark., 2014). Bazı araştırmacılar (Kirkpatrick ve ark., 1998; Odds ve Davidson, 2000; Marinho ve ark., 2010; Schoofs ve ark., 1997) bu türler arasında koloni renk yoğunluğunda farklar bulunduğunu, *C. albicans* kolonilerinin soluk mavi yeşil, *C. dubliniensis* kolonilerinin ise koyu yeşil koloniler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kromojenik besiyeri olarak CHROMagar Candida kullanılmıştır. Fenotipik testlerle *C. albicans* olarak tanımlanan 5 izolat ve pozitif kontrol kromojenik besiyerinde mavi-yeşil renkli koloniler oluştururken, diğer maya türleri pembe ya da mor renkli koloniler oluşturdu. Bu çalışma *C. albicans*'ın tanımlanmasında CHROMagar Candida kromojenik besiyerlerinin kullanılmasını tavsiye eden araştırmacıları (Deorukhkar ve Roushani, 2018; Ergon ve ark., 2018; Gültekin ve ark., 2013) desteklemektedir. Nitekim, yapılan çalışmalarda CHROMagar Candida besiyerinin *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinin tanımlanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (Ergon ve ark., 2018; Gültekin ve ark., 2013). Imran ve Al-Shukry (2014) ise CHROMagar Candida'nın *Candida* türlerinin ön teşhisinde her zaman kullanılmayacağını bildirmişlerdir.

Günümüzde *C. albicans*'ın hızlı tanısı amacıyla PZR testleri kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2012; Madhavan ve ark., 2011; Mousa ve ark., 2016; Şahiner ve ark., 2011; Tarini ve ark., 2010). PZR testleri, *C. albicans* ile fenotipik özellikleri ile büyük benzerlik gösteren *C. dubliniensis*'in ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2012). Bu nedenle de germ tüp testi, klamidospore oluşumu gibi fenotipik testlere başvurulmadan *C. albicans*'ın teşhisinin PZR ile spesifik primerler kullanılarak yapılabileceği bildirilmektedir (Ahmad ve ark., 2012; Imran ve Al-Shukry, 2014). Bu çalışmada fenotipik testlerle *C. albicans* olduğu saptanan 5 izolat, kontrol suşu ve diğer maya izolatları PZR ile test edildi. Sadece fenotipik testlerle *C. albicans* olarak tanımlanan izolatlar ile kontrol suşu, *C. albicans* spesifik gen bölgesini kodlayan CALB primerlerinin kullanıldığı PZR'da pozitif bulundu. Benzer şekilde Imran ve Al-Shukry (2014) *C. albicans*'ın teşhisinde

aynı primerlerinin kullanıldığı PZR çalışmasında, *C. albicans* izolatlarının pozitif bantlar oluştururken, diğer *Candida* izolatlarının oluşturmadığını göstermişlerdir. Eldesouky ve ark. (2016) klinik mastitisli ineklerden izole edilen ve fenotipik testlerle *C. albicans* olarak identifiye edilen 12 izolatın 8'inin PZR ile *C. albicans* olarak doğrulandığını, 4 izolatın *C. dubliniensis* olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden ayrımında fenotipik testler ile moleküler testler uyumlu bulunmuştur. Birçok araştırmacı (Eldesouky ve ark., 2016; Imran ve Al-Shukry 2014; Kirckpatrick ve ark., 1998) fenotipik testler ile moleküler testlerin uyumlu olmadığını, PZR ile teşhisin fenotipik testlerle karşılaştırıldığında kısa sürede ve doğru sonuç verdiğini rapor etmiştir. Fenotipik testlerdeki farklılıkların, yorumlayan araştırmacıların tecrübesine, kullanılan besiyerlerine ve *Candida* izolatlarının özelliklerine göre farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (Gültekin ve ark., 2013; Madhavan ve ark., 2011; Pincus ve ark., 2007).

ALS1, *ALS* gen ailesinin en fazla eksprese edilen genidir (Ali ve ark., 2015). *C. albicans* izolatlarının ağız ve vajinaya tutunması ve biyofilm oluşumundan sorumlu genidir (Green ve ark., 2004; Kamai ve ark., 2002; Monroy-Pérez ve ark., 2016; Roubarmohammadi ve ark., 2016). Monroy-Pérez ve ark. (2016) vulvavajinal kandidiazisli kadınlardan izole edilen *C. albicans* izolatlarının tümünde *ALS1* ve *PLB1* saptadıklarını bildirmişlerdir. İnci ve ark. (2013) hastalardan izole edilen *C. albicans*'ların %53,9'unda, Ali ve ark. (2015) Irak'ta hastalardan izole edilen 25 (8 ağız sıvabı, 9 vajinal sıvab, 4 idrar, 3 deri, 1 tırnak klipsi) *C. albicans* izolatında *ALS1* gen varlığını araştırdıkları çalışmada, ağızdan 7, vajinadan 1, idrardan 4, deriden 3 ve tırnak klipsinden 1 izolatta bu geni saptadıklarını bildirmişlerdir. Roubarmohammadi ve ark. (2016) vajinitis bulunan hastalardan izole edilen 53 *C. albicans*'ın 40'ında *ALS1* saptamışlardır.

Mousa ve ark. (2016) mastitisli sütlerden izole edilen 4 ve sağlıklı sütlerden izole edilen 1 *C. albicans* izolatında *ALS1* gen varlığını araştırdıkları çalışmada, mastitisli sütlerden elde edilen *C. albicans* izolatlarının sadece 2'sinde *ALS1* geni saptadıklarını, sağlıklı sütlerden elde edilen izolatta bu genin belirlenemediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada tüm maya izolatlarında *ALS1* geni araştırıldı. Sadece PZR ile *C. albicans* olduğu doğrulanan 5 izolatın 3 (%80)'ünde *ALS1* geni saptanmıştır.

İzolaların 2'sinde *ALS1* geninin saptanamaması, adhezyonda diğer *ALS* proteinlerinin veya diğer adhezyon mekanizmalarının rol oynaması ile açıklanabilir. Nitekim mastitisli sığırların süt örneklerinden *HWP1* adhezyon geninin saptanma oranının *ALS1* geninden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Mousa ve ark., 2016). Aynı araştırmacılar konakçının enfekte ettiği organa bağlı olarak *C. albicans* izolatlarında farklı adhezyon mekanizmalarının rol oynayabileceğini rapor etmişlerdir. *ALS1* negatif *C. albicans* izolatının birinde *PLB1* saptanırken, diğerinde belirlenememiştir. *ALS1* ve *PLB1* negatif *C. albicans* izolatının biyofilm oluşturma yeteneğinin de zayıf pozitif olduğu belirlenmiştir. Bundan dolayı bu *C. albicans* izolatının flora etkeni olabileceği düşünülmüştür. Nitekim sağlıklı hayvanlardan da *C. albicans* izole edilebilmektedir (Mousa ve ark., 2016; Türkyılmaz ve Kaynarca, 2010). Fakat sağlıklı sütlerden izole edilen *C. albicans* izolatlarında virülens genleri saptanamamıştır (Mousa ve ark., 2016). Ayrıca *ALS1* geninin *C. albicans* enfeksiyonunun erken safhasında konakçıya tutunmasında ve biyofilm oluşumunda önemli olduğu bildirilmiştir (Green ve ark., 2004; Kamai ve ark., 2002).

Klinik mastitisli ineklerden elde edilen *C. albicans* izolatlarının tümünde *PLB1* geni saptandığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Eldesouky ve ark., 2016; Mousa ve ark., 2016). Hakim ve ark. (2013) Kareish peynirlerinden izole ettikleri 5 *C. albicans* izolatının tümünde *PLB1* saptadıklarını, PZR'ın fosfolipaz aktivitesini belirlemede hızlı ve sensitif bir metod olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Monroy-Pérez ve ark. (2016) vulva-vajinal kandidiazisli kadınlardan elde edilen *C. albicans* izolatlarının tümünde *PLB1* varlığını göstermişlerdir. Ayrıca, Naglik ve ark. (2003) oral enfeksiyonlu hastalardan ve hastalık bulunmayan kişilerden elde edilen *C. albicans* izolatlarının sırasıyla %58 ve %14'ünden, vajinal enfeksiyona sahip olan ve olmayan kadınlardan elde edilen izolatlarda ise sırasıyla %63 ve %43 *PLB1* geni saptandığını bildirmişlerdir.

Mastitisli sütlerden izole edilen *C. albicans*'larda *PLB1* geni bildirilmesine karşın (Eldesouky ve ark., 2016; Mousa ve ark., 2016), bu çalışmada *C. albicans* izolatlarının sadece 3'ünde *PLB1* geni belirlendi. İzolatların 2'sinde *PLB1* geninin saptanamaması, bu izolatların flora etkeni olması ile açıklanabilir. Nitekim sağlıklı hayvanlardan izole edilen *C. albicans*'larda *PLB1* geni saptanamamıştır (Mousa ve

ark., 2016). *C. albicans* izolatlarında *PLB1* geninin önemli bir virülens faktörü olduğu, bu genin çıkarılması ile elde edilen mutant suşların hayvanlara verildiğinde enfeksiyonun virülensinde azalma olduğu bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2001).

Bu çalışmada *PLB1* pozitif bir izolatın *ALS1* genine sahip olmadığı, yine *ALS1* geni için pozitif bir izolatın *PLB1* geni taşımadığı saptandı. Bu durum *Candida* izolatlarında enfeksiyonun meydana geldiği bölgeye göre virülens faktörlerinde farklılık bulunabileceğini bildiren araştırmaları (Ali ve ark., 2015; Mousa ve ark., 2016; Naglik ve ark., 2003) desteklemektedir. *ALS* proteinleri adhezyondan ve biyofilm oluşumundan sorumludur ve 8 gen tarafından kodlanmaktadır (Hoyer, 2001). Sunulan bu çalışmada sadece *ALS1* geni araştırılmış olup, *PLB1* pozitif olan izolatta diğer *ALS* genlerinin bulunabileceği düşünülmektedir. *C. albicans* izolatlarının 1'inde her iki virülens geni *ALS1* ve *PLB1* saptanamadı. Bu genler, *C. albicans*'ın en önemli virülens faktörleridir. Bu nedenle bu izolatların florada bulunan *C. albicans* izolatları olabileceği düşünüldü. İzolatların 2'si her iki virülens geni bakımından pozitif saptandı.

Biyofilm *C. albicans* izolatlarının konakçıya tutunmasında en önemli virülens faktörüdür. *ALS* genlerinin biyofilmle ilişkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Green ve ark., 2004; İnci ve ark., 2013; Roudbarmohammedi ve ark., 2016). *C. albicans*'da biyofilm oluşumu mikropleytte ve tüpte değerlendirilmektedir (İnci ve ark., 2013). Bu çalışmada biyofilm oluşumu tüp adherens yöntemiyle belirlenmiş olup, izolatların 3'ü güçlü pozitif, 1'i zayıf pozitif tespit edilmiştir. *ALS1* gen varlığı ile biyofilm oluşumu karşılaştırıldığında güçlü pozitif oluşturan 3 izolattan birinin *ALS1* geni taşımadığı saptandı. Bu durum diğer *ALS* genlerinin varlığı veya diğer adhezyon mekanizmaları ile açıklanabilir. *HWP1* adhezyondan sorumlu diğer bir gen olup, mastitisli sütlerden elde edilen *C. albicans*'larda saptanma oranının *ALS1*'e göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Mousa ve ark., 2016). Güçlü pozitif biyofilm oluşturan izolatlardan birinin aynı zamanda *PLB1* negatif olduğu belirlendi. Bu çalışmada sadece 2 izolatın araştırılan tüm virülens genleri bakımından pozitif olduğu saptandı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile ilk kez Türkiye’de hayvanlardan izole edilen *C. albicans* izolatlarında önemli virülens genleri olan *ALS1* ve *PLB1* genlerinin varlığı saptanmıştır.

1. Bu çalışma ile mastitis problemi olan ve tedavi edilmesine karşın sürekli tekrarlayan veya antibiyotik tedavisine cevap vermeyen işletmelerde *C. albicans*’ın mastitis etkeni olabileceği,
2. İzole edilen *Candida* izolatlarında germ tüpü ve klamidosporelerin saptanması ile *C. albicans* olarak ön teşhisinin doğru bir şekilde yapılabileceği,
3. *C. albicans* izolatlarında PZR ile virülens faktörlerinin gösterilebileceği,
4. *C. albicans* izolatlarında *ALS1* ve *PLB1* virülens genlerinin farklı oranlarda bulunabileceği,
5. *ALS* genleri ile biyofilm oluşturma arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla tüm *ALS* genlerinin ve diğer adhezyondan sorumlu genlerin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.
6. Ayrıca, mastitisli sütlerde saptanan virülens genlerinin, insanlardan izole edilen *C. albicans* izolatlarında da bildirilmiş olması, bu izolatların çiğ süt ve süt ürünleri aracılığıyla duyarlı kişilerce alınması durumunda hastalık oluşturma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle insanların mikotik enfeksiyonlarında süt kaynaklı bulaşmaya dikkat çekilmelidir.

KAYNAKLAR

Abacı Ö, Haliki A (2004). *Candida albicans*'ın Virulans Faktörleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040901.pdf> (Erişim Tarihi: 05.11.2018).

Ahmad S, Khan Z, Asadzadeh M, Theyathel A, Chandy R (2012). Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *BMC Infect Dis.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3541108/> (Erişim Tarihi: 01.12.2018).

Akçam-Aysan E (2009). *Çukurova üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde izlenen kandidemi olgularının epidemiyolojik, klinik ve antifungal duyarlılık yönünden incelenmesi.* Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Al-Bassam T, Poulain D, Giummelly P, Lematre J, Bonaly R (1985). Chemical and antigenic alterations of *Candida albicans* cell walls related to the action of amphotericin B sub-inhibitory doses. *J Antimicrob Chemother.*, **15**, 263-269.

Ali AS, Al-Attraqhch SD, Al-Ahmar SD (2015). Molecular detection of *ALS1* virulence gene of *Candida albicans* isolated from groups of Iraqi patients. *J Fac Med Baghdad.*, **57**, 79-83.

Ali HH, Al-Obaidi RM, Fattah CH (2015). Molecular identification of *Candida* species isolated from ears of dogs infected with otitis externa by detecting internal transcript spacer (ITS1 and ITS4) in Sulaimania, Iraq. *Adv Anim Vet Sci.*, **3**, 491-499.

Altun HU, Şener B (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Med J.*, **39**, 82-8.

Anderson J, Mihalik R, Soll DR (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *J Bacteriol.*, **172**, 224-235.

Aras Z (2011). Mikrobiyolojide hızlı tanı yöntemleri. *Türk Hij Den Biyo Derg.*, **68**, 97-104.

Arda (2015). *Temel Mikrobiyoloji*, 5. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 14-359.

Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M (2006). *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. 1. Baskı, Ankara: İlke-Emek Yayınları, s: 5-29.

Banerjee A, Ganesan K, Datta A (1991). Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.*, **137**, 2455-2461.

Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA (1999). Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol.*, **37**, 531-537.

Birinci A, Tanrıverdi-Çaycı Y (2016). Mantar enfeksiyonlarının serolojik tanısı. *Türk Hij Den Biyo Derg.*, **73**, 175-182.

Byadarahally-Raju S, Rajappa S (2011). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3205665/> (Erişim Tarihi: 05.12.2018).

Calderone RA, Fonzi WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, **9**, 327-335.

Calderone RA (2002). *Taxonomy and biology of Candida*. In: Calderone RA. (Eds), *Candida and Candidiasis*. 1st Edition Washington DC: American Society for Microbiology press, p: 15-27.

Campbell CK, Holmes AD, Davey KG, Szekely A, Warnock DW (1998). Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **17**, 367-368.

Chen YC, Wu CC, Chung WL, Lee FJ (2002). Differential secretion of *Sap4-6* proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology.*, **148**, 3743-3754.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JA (1995). Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.*, **22**, 996-1006.

Cohen JM, Ross MW, Busschers E (2008). Diagnosis and management of *Candida utilis* infectious arthritis in a Standardbred filly. *Equine vet Educ.*, **20**, 348-352.

Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Coutinho SD, Castilho W, Teixeira CM (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of Silo Paulo, Brazil. *Mycopathologia.*, **124**, 13-17.

Costa GM, Pereira UP, Souza-Dias MAG, Silva N (2012). Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. *Braz J Vet Res Anim.*, **49**, 239-243

Coutinho HDM (2009). Factors influencing the virulence of *Candida spp.* *West Indian Med J.*, **58**, 160-163.

Cutler JE (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.*, **45**, 187-218.

Czernomysy-Furowicz D, Karakulska J, Silecka A (2008). Ethiological agents of mastitis in dairy cows on a farm in the west Pomeranian region. *Acta Sci Pol.*, **7**, 3-10.

Çerikçioğlu N (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *ANKEM Derg.*, **26**, 261-269.

Çiçek AÇ, Koç AN, Ertürk A, Demir G, Bahçeci İ (2014). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Abant Med J.*, **3**, 248-252.

Deorukhkar S, Roushani S (2018). Identification of *Candida* species: conventional methods in the era of molecular diagnosis. *Ann Microbiol Immunol.*, **1**, 1002.

Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG, La Montagne JR (1996). Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep.*, **111**, 226-235.

Douglas LJ (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, **11**, 30-36.

Duchaussoy AC, Rose A, Talbot JJ, Barrs VR (2015). Gastrointestinal granuloma due to *Candida albicans* in an immunocompetent cat. *Med Mycol Case Rep.*, **10**, 14-17.

Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegańska M (2012). High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. *Sci WORLD J.*, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/196347> (Erişim Tarihi: 22.08.2018).

Eldesouky I, Mohamed N, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, El-Ballal S, Effat M, Shabrawy MAL (2016). *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **22**, 461-464.

Elorza MV, Murgui A, Sentandreu R (1985). Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. *J Gen Microbiol.*, **131**, 2209-2216.

Ener B (2011). Fungal infeksiyonlarda tanı. *ANKEM Derg.*, **25**, 156-161.

Er DK, Uzuner H, Genç S, Keçeli S (2015). Germ tüp testinin müeller hinton agar ve serumda karşılaştırılması. *KOU Sag Bil Derg.*, **1**, 30-34.

Erbaş G, Parın U, Kırkan Ş, Savaşan S, Özavcı MV, Yüksel HT (2017). Identification of *Candida* strains with nested PCR in bovine mastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turk J Vet Anim Sci.*, **41**, 757-763.

Ergon MC, Tunç B, Doluca-Dereli M (2018). Maya mantarlarının identifikasyonunda iki farklı kromojenik besiyerinin karşılaştırılması. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **32**, 23-31.

Fenn JP, Segal S, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carrol K (1994). Comparison of Updated Vitek Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *J Clin Microbiol.*, **32**, 1184-1187.

Feyzioğlu B, Doğan M, Özdemir M, Baykan M, Baysal B (2014). *Candida* türlerinin tanımlanmasında corn meal agar, *Candida* ID2 kromojenik besiyeri ve API 32 IDC performansının değerlendirilmesi. *Selçuk Tıp Derg.*, **30**, 43-45.

Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbil Rev.*, **12**, 80-96.

Foley GL, Schlafer DH (1987). *Candida* abortion in cattle. *Vet Pathol.*, **24**, 532-536.

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P (2001). Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Medical Mycology.*, **39**, 9-33.

Ghannoum MA (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.*, **13**, 122-143.

Ghannoum MA, Abu-Elteen KH (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses.*, **33**, 265-282.

Gökce G, Cerikcioglu N, Yagci A (2007). Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.*, **164**, 265-269.

Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL (2004). RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology.*, **150**, 267-275.

Guitard J, Atanasova R, Brossas JY, Meyer I, Gits M, Marinach C, Vellaissamy S, Angoulvant A, Mazier D, Hennequin C (2015). *Candida inconspicua* and *Candida norvegensis*: New Insights into Identification in Relation to Sexual Reproduction and Genome Organization. *J Clin Microbiol.*, **53**, 1655–1661.

Gültekin A, Koç AN, Atalay MA (2013). *Candida* türlerinin tanımlanmasında kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, **22**, 24-30.

Hakim AS, Abuelnaga SM, Sayed El Ahl MH (2013). Isolation, biochemical identification and molecular detection of yeasts from kareish cheese. *Intl J Microbiol Res.*, **4**, 95-100.

Hautala T, Ikäheimo I, Husu H, Säily M, Siitonen T, Koistinen P, Vuopio-Varkila J, Koskela M, Kujala P (2007). A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. *BMC Infect Dis.*, **7**, 97.

Hawkins JL, Baddour LM (2003). *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clinical Infectious Diseases*, **16**, 15-18.

Hierro N, González Á, Mas A, Guillamón JM (2004). New PCR- based methods for yeast identification. *J Appl Microbiol.*, **97**, 792-801.

Howard DH (2003). *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*, Vol: 16, Marcel Dekker, New York, p: 499-553.

Hoyer LL (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, **9**, 176-180.

Hoyer LL, Cota E (2016). *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (*Als*) family vignettes: a review of *Als* protein structure and function. *Front Microbiol.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791367/pdf/fmicb-07-00280.pdf> (Erişim Tarihi: 10.10.2018).

Hörmansdorfer S, Bauer J (2000). *Yeast infections in veterinary medicine*. In: Ernst JF, Schmidt A. (Eds), *Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts*, Karger, Basel, vol 5, p:54-78.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJP, Gow NAR (1994). Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.*, **14**, 87-99.

Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.*, **63**, 1993-1998.

Imran ZK, Al-Shurkry HN (2014). Molecular diagnosis of vaginal candidiasis by polymerase chain reaction (PCR) and random amplification polymorphism DNA (RAPD-PCR) in Babylon Province, Iraq. *Afr J Microbiol Res.*, **8**, 496-502.

Iwata K, Uchida K, Hiratani T, Yamamoto Y (1975). Analysis of in vivo action of candidotoxin. *Nihon Saikingaku Zasshi.*, **30**, 235.

İnci M, Atalay MA, Koç AN, Özer B, Kılınc Ç, Durmaz S (2012). *Candida albicans* dışı mayaların tanımlanmasında VITEK 2 YST kart ile API 20C AUX sisteminin karşılaştırılması. *Dicle Tıp Derg.*, **39**, 80-82.

İnci M, Atalay MA, Özer B, Evirgen Ö, Duran N, Köksaldı-Motor V, Koç AN, Önlen Y, Kılınc Ç, Durmaz S (2013). Investigations of *ALS1* and *HWP1* genes in clinical isolates of *Candida albicans*. *Turk J Med Sci.*, **43**, 125-130.

Kadry AA, El-Ganiny AM, El-Baz AM (2018). Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Afr Health Sci.*, **18**, 1166-1174.

Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG (2002). Contribution of *Candida albicans ALS1* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun.*, **70**, 5256-5258.

Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH (2007). Çeşitli *Candida* türlerinin iki farklı triazole duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. *Eurasian J Med.*, **39**, 173-177.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol.*, **56**, 211-224.

Khan MJA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J (2000). *Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to Candida albicans*, In: Ahmad I, Shahid M, Owais M, Akil F. (Eds), Combating Fungal Infections, Problems and Remedy, New York: Springer, p: 21-45.

Kidd S, Halliday C, Alexiou H, Ellis D (2016). *Descriptions of Medical Fungi*, 3rd, Australia: Adelaide by Newstyle Printing, p: 34-50.

Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, Sanche RE, Cantu RA, Rinaldi MG, Patterson TF (1998). Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol.*, **36**, 3007-3012.

Kojic EM, Darouiche RO (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev.*, **17**, 255-267.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th Edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p: 983-1069.

Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, **59**, 873-880.

Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Rózański P (2001). Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia.*, **150**, 5-7.

Kuhn DM, Ghannoum MA (2004). *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr Opin Investig Drugs.*, **5**, 186-197.

Kuhn DM, Mikherjee PK, Clark TA, Pujol C, Chandra J, Hajjeh RA, Warnock DW, Soil DR, Ghannoum MA (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis.*, **10**, 1074-1081.

Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, Bautsch W, Molitor M, Frosch M, Mühlshlegel FA (2000). Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. *J Mol Med (Berl.)*, **78**, 521-529.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Merz WG (1988). Association of electrophoretic karyotype of *Candida stellatoidea* with virulence for mice. *Infect Immun.*, **56**, 1814-1819.

Kwon-Chung KJ, Riggsby WS, Uphoff RA, Hicks JB, Whelan WL, Reiss E, Magee BB, Wickes BL (1989). Genetic differences between type I and type II *Candida stellatoidea*. *Infect Immun.*, **57**, 527-532.

Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, Fonzi W, Mirbod F, Nakashima S, Nozawa Y, Ghannoum MA (1998). Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem.*, **273**, 26078-26086.

Lipperheide V, Andraka L, Pontón J, Quindós G (1993). Evaluation of the albicans IDR plate method for the rapid identification of *Candida albicans*. *Mycoses.*, **36**, 417-420.

Luo G, Mitchell TG (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, **40**, 2860-2865.

Mackenzie DWR (1962). Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Path.*, **15**, 563-565.

Madhavan P, Jamal F, Chong PP (2011). Laboratory isolation and identification of *Candida* species. *J Applied Sci.*, **11**, 2870-2877.

Marinho SA, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CAS, Cherubini K, Oliveira SD (2010). Identification on *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Braz J Microbiol.*, **41**, 286-294.

Marklein G, Josten M, Klanke U, Muller E, Horre R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.*, **47**, 2912–2917

Martínez JP, Gil ML, López-Ribot JL, Chaffin WL (1998). 1998 Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev.*, **11**, 121-141.

Matthews R, Burnie J (1998). The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: applications in prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev.*, **17**, 255-267.

Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, **4**, 119-128.

McGinnis MR, Tyring SK (1996). *Introduction to Mycology*. In: Baron S. (Eds), Medical Microbiology, 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/book/NBK8125/> (Erişim Tarihi: 16.10.2018).

Mehta A, Kumar M, Bhumbla U, Vyas A, Dalal AS (2018). Comparison of different media for germ tube production by *Candida albicans*: a retrospective study. *Int J Curr Microbiol App Sci.*, **7**, 819-823.

Miceli MH, Diaz J, Lee SA (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.*, **11**, 142-151.

Milner RJ, Picard J, Tustin R (1997). Chronic episodic diarrhoea associated with apparent intestinal colonisation by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida famata* in a German shepherd dog. *J S Afr Vet Assoc.*, **68**, 147-149.

Mirhendi H, Diba K, Rezaei A, Jalalizand N, Hosseinpour L, Khodadadi H (2007). Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian J Publ Health.*, **36**, 40-44.

Mitchell AP (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol.*, **1**, 687-692.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.*, **1**, 95-106.

Monroy-Pérez E, Paniagua-Contreras GL, Rodríguez-Purata P, Vaca-Paniagua F, Vázquez-Villaseñor M, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S (2016). High virulence and antifungal resistance in clinical strains of *Candida albicans*. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5930489> (Erişim Tarihi: 15.10.2018).

Moretti A, Posteraro B, Boncio L, Mechelli L, De Gasperis E, Agnetti F, Raspa M (2004). Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. *Rev Iberoam Micol.*, **21**, 139-142.

Mousa W, Elmonir W, Abdeen (2016). Molecular typing, virulence genes and potential public health implications of *Candida albicans* isolated from bovine milk. *Jpn J Vet Res.*, **64**, 211-215.

Mukherjee PK, Chandra J (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat.*, **7**, 301-309.

Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J, Cole GT, Ghannoum MA (2001). Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology.*, **147**, 2585-2597.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **67**, 400-428.

Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P (2006). *Candida albicans* *HWP1* gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol.*, **55**, 1323-1327

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.*, **154**, 3266-3280.

Nas T, Kalkanci A, Fidan I, Hizel K, Bolat S, Yolbakan S, Yilmaz E, Ozkan S, Kustimur S (2008). Expression of *ALS1*, *HWP1* and *SAP4* genes in *Candida albicans* strains isolated from women with vaginitis, *Folia Microbiol (Praha).*, **53**, 179-183.

Navarro-García F, Sánchez M, Nombela C, Pla J (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol.*, **25**, 245-268.

Nerurkar A, Solanky P, Chavda N, Baria H, Desai B (2012). Isolation of *Candida* species in clinical specimens and its virulence factor: the biofilm. *Int J Med Sci Public Health.*, **1**, 97-100.

Nicastri E, Petrosillo N, Viale P, Ippolito G (2001). Catheter-related bloodstream infections in HIV-infected patients. *Ann N Y Acad Sci.*, **946**, 274-290

Nobile CJ, Mitchell AP (2006). Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.*, **8**, 1382-1391.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, Mitchell AP (2008). Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.*, **18**, 1017-1024.

Nobile CJ, Johnson AD (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol.*, **69**, 71-92.

Odds FC (1985). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol.*, **12**, 45-93.

Odds FC (1994). *Candida* species and virulence. *ASM News.*, **60**, 313-318.

Odds FC, Davidson A (2000). "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **38**, 147-150.

Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, Morace G, Blasi E (2014). Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. *J Biol Regul Homeost Agents.*, **28**, 743-752.

Ozturk D, Turutoglu H, Pehlivanoglu F, Guler L (2016). Virulence genes, biofilm production and antibiotic susceptibility in *Trueperella pyogenes* isolated from cattle. *Isr J Vet Med.*, **71**, 36-42.

Pachauri S, Varshney P, Dash SK, Gupta MK (2013). Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. *Vet World.*, **6**, 393-395.

Pendrak ML, Klotz SA (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol Lett.*, **129**, 103-114.

Perlroth J, Choi B, Spellberg B (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.*, **45**, 321-346.

Perry JL, Miller GR, Carr DL (1990). Rapid, colorimetric identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.*, **28**, 614-615.

Pincus DH, Orenga S, Chatellier S (2007). Yeast identification - past, present, and future methods. *Med Mycol.*, **45**, 97-121.

Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D (1998). Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.*, **36**, 2093–2095.

Piyade M (2004). *Afyon yöresinde klinik örneklerden soyutlanan Candida türlerinin identifikasyonu ve antimikotik duyarlılıkları.* Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

Pomés R, Gil C, Nombela C (1985). Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. *J Gen Microbiol.*, **131**, 2107-2113.

Pujol C, Renaud F, Mallié M, de Meeus T, Bastide JM (1997). Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. *J Med Vet Mycol.*, **35**, 115-121.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*, 2nd ed, United State;, John Wiley and Sons Ltd, p: 413-483.

Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR (1999). *Clinical Veterinary Microbiology.* St Louis, United States: Mosby Ltd, p: 367-420.

Rahimi H, Roudbarmohammadi S, Kachouei R, Roudbari M (2013). Expression of *Candida albicans* ALS 2 and ALS 9 genes isolated from women with vaginal candidiasis by RT-PCR. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*, **16**, 39-49.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.*, **4**, 633-638.

Ramla S, Sharma V, Patel M (2005). Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from the oral cavities of cancer patients. *Support Care Cancer.*, **24**, 2429-2436.

Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katirae F, Mohammadi R, Falahati M (2016). ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. *Adv Biomed Res.*, **5**, 105.

Sampath A, Weerasekera M, Dilhari A, Gunasekara C, Bulugahapitiya U, Fernando N, Samaranyake L (2017). Comparison of duplex PCR and phenotypic

analysis in differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* from oral samples. *AMB Express.*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5487313/> (Erişim Tarihi: 22.12.2018).

Sandven P (1990). Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odontol Scand.*, **48**, 27-36.

Santos RC, Marin JM (2005). Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia.*, **159**, 251-253.

Sartori LCA, Santos RC, Marin JM (2014). Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, **66**, 1615-1617.

Schmitt JA (1971). Epidemiological investigations of oral *Candida albicans*. *Mycopathol Mycol Appl.*, **43**, 65-87.

Schoofs A, Odds FC, Colebunders B, Ieven G, Goossens H (1997). Recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV patients: use of specialized isolation media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **16**, 296-300.

Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, Ergin Ç, Hilmioğlu-Polat S, Melchers W, Verweij P (2015). *Candida* ve kandidoz: epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, **45**, 1-11.

Seyer A, Yaman M, Khalil I, Biter G, Yalçın B, Kalkancı A, Kuştimur S (2009). Çeşitli besiyerlerinde *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, **39**, 69-72.

Sharkey LL, McNemar MD, Saporito-Irwin SM, Sypherd PS, Fonzi WA (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1. *J Bacteriol.*, **181**, 5273-5279.

Shoham S, Marr KA (2012). Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Future Microbiol.*, **7**, 639-655.

Slutsky B, Buffo J, Soll DR (1985). High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science.*, **230**, 666-669.

Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR (1987). "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol.*, **169**, 189-197.

Songer JG, Post KW (2005). Veterinary microbiology: *bacterial and fungal agents of animal disease*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, p: 351-404.

Sönmez E, Durmaz B, Çınar Y, Aydoğdu İ, Tekerekoğlu S, Tümbay E (1997). Nazokomiyal kandidemi: iki olgu sunumu. *J Turgut Ozal Med Cent.*, **4**, 103-106.

Srikantha T, Chandrasekhar A, Soll DR (1995). Functional analysis of the promoter of the phase-specific WHII gene of *Candida albicans*. *Mol Cell Bioll.*, **5**, 1797-1805.

Staib F (1965). Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia.*, **4**, 187-193.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Köhler G, Michel S, Hof H, Hacker J, Morschäuser J (1999). Host-induced, stage-specific virulence gene activation in *Candida albicans* during infection. *Mol Microbiol.*, **32**, 533–546.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J (2000). Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **23**, 6102-6017.

Stefanetti V, Marenzoni ML, Lepri E, Coletti M, Casagrande Proietti P, Agnetti F, Crotti S, Pitzurra L, Del Sero A, Passamonti F (2014). A case of *Candida guilliermondii* abortion in an Arab mare. *Med Mycol Case Rep.*, **3**, 19-22

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov. : phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology.*, **141**, 1507-1521.

Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley DB, Coleman DC (1996). Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol.*, **44**, 399-408.

Susever S, Yeğenoğlu Y (2012). İmmün sistemi baskılı hastaların klinik örneklerinden soyutlanan *Candida* türlerinin PCR ile belirlenmesi ve antifungal direnç genlerinin RFLP ve sekans analizi ile saptanması. *Dicle Tıp Dergisi*, **39**, 242-250.

Sweet SP, Cookson S, Challacombe SJ (1995). *Candida albicans* isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibit enhanced adherence to epithelial cells. *J Med Microbiol.*, **43**, 452–457.

Şahan-Yapıcıer Ö, Şababoğlu E, Kaya M, Öztürk D, Pehlivanoğlu F, Türütoğlu H (2018). Otitis eksternalı köpeklerden izole edilen fungal etkenler. *MEA Vet Fak Derg.*, **3**, 121-124.

Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardiç N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T (2011). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul.*, **45**, 478-488.

Şeker E (2010). Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia.*, **169**, 303-308.

Şeker E, Özenç E (2011). In vitro biofilm activity of *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes with mastitis in Western Turkey. *Vet Arhiv.*, **81**, 723-730.

Tarfarosh MA, Purohit SK (2008). Isolation of *Candida* spp. from mastitic cows and milkers. *Vet Scan.*, **2**, 14-15.

Tarini NMA, Wahid MH, Ibrahim F, Yasmon A, Djauzi S (2010). Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp. *Med J Indones.*, **19**, 83-87.

Teoh F, Pavelka N (2016). How chemotherapy increases the risk of systemic candidiasis in cancer patients: current paradigm and future directions. *Pathogens.*, <https://doi.org/10.3390/pathogens5010006> (Erişim Tarihi: 22.11.2018).

Tsuboi R, Ogawa H, Bramono K, Richardson MD, Shankland GS, Crozier WJ, Sei Y, Ninomiya J, Nakabayashi A, Takaiuchi I (1994). Pathogenesis of superficial mycoses. *J Med Vet Mycol.*, **32**, 91-104.

Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW, Edwards JE Jr, Filler SG (2000). Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun.*, **68**, 1997-2002.

Türkyılmaz S, Kaynarca S (2010). The slime production by yeasts isolated from subclinical mastitic cows. *Acta Vet Brno.*, **79**, 581-586.

Velasco MC (2000). *Candidiasis* and *Cryptococcosis* in birds. *Semin Avian Exot Pet Med.*, **9**, 75-81.

Wawron W, Bochniarz M, Dąbrowski R (2010). Antifungal susceptibility of yeasts isolated from secretion of inflamed mammary glands in cows. *Pol J Vet Sci.*, **13**, 487-490.

Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, Ginocchio CC, Lewinski MA, Manji R, Mochon AB, Procop GW, Richter SS, Rychert JA, Sercia L, Burnham CA (2013). Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol.*, **51**, 2267-2272.

Wibawa T (2016). The role of virulence factors in *Candida albicans* pathogenicity. *J Med Sci.*, **48**, 58-68.

Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL (2006). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p: 1151-1243.

Yang YL (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect.*, **36**, 223-228.

Yeo SF, Wong B (2002). Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.*, **15**, 465-484.

Yücel A, Kantarcıoğlu S (1999). Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. *Cerrahpaşa J Med.*, **30**, 236-246.

Yücesoy M (1999). *Candida* türlerinin virulans faktörleri ve konağa ait faktörler. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. **13**, 377-388.

Zaragoza CS, Olivares RA, Watty AE, Moctezuma Ade L, Tanaca LV (2011). Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol.*, **28**, 79-82.

EKLER

ANKET FORMU

EK-1

1. İşletmede kaç tane sağılan inek vardır?

.....

2. İşletmede hijyen kurallarına dikkat ediliyor mu?

Evet Hayır

3. Sağım nasıl yapılıyor?

El Sağım makinası

4. Daha önce mastitis sorunu ile karşılaştınız mı?

Evet Hayır

5. Ne kadar sıklıkla mastitis ile karşılaşıyorsunuz?

.....

6. Mastitis tedavisi kim tarafından yapılıyor?

Yetiştirici Veteriner Hekim

7. Tedavi nasıl yapılıyor?

Laboratuvar sonucuna göre Direk antibiyotik uygulaması

8. Tedaviye yanıt alamadığınız oluyor mu?

Evet Hayır

9. İyileşmeyen hayvanı ne yapıyorsunuz?

.....

Ad Soyad:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Orçun Sav
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya 03.08.1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Telefon No : 05547262069
Elektronik Posta : orcunsav888@gmail.com
İletişim Adresi :Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Burdur



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):
Lise: USO Anadolu Lisesi - 2010
Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi - 2016
Yüksek Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı – Devam Ediyor

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

- 1.
- 2.
- ...

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

1. **Şahan Yapıcıer Ö, Saatçi M, Yaman S, Sav O (2018).** Effects of energized oxygen in drinking water to laying hens feces microorganism count, International Poultry Science of WPSA Turkish Branch, 9-12 May, Niğde, 275-280.
- 2.
- ...

Üyesi Olduğu Mesleki Kuruluşlar

- 1.
- 2.
- ...

