



**MASTİTİSLİ ANADOLU MANDALARI VE SÜT
İNEKLERİNDEN *Candida* TÜRLERİNİN
İZOLASYONU, MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ,
VİRÜLENS FAKTÖRLERİ VE ANTİFUNGAL
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oğuz Kağan TÜREDİ
Doktora Tezi
Danışman: Prof. Dr. Esra ŞEKER
Tez No: 2024-001

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

MASTİTİSLİ ANADOLU MANDALARI VE SÜT İNEKLERİNDEN
Candida TÜRLERİNİN İZOLASYONU, MOLEKÜLER
TIPLENDİRİLMESİ,
VİRÜLENS FAKTÖRLERİ VE ANTİFUNGAL
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
OĞUZ KAĞAN TÜREDİ

Danışman
Prof. Dr. ESRA ŞEKER

Tez No: 2024-001

AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje Araştırmaları Koordinasyon
Birimi (BAPK) Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: “20.SAĞ. BİL.32”

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ENSTİTÜ ONAYI

Öğrencinin	Adı- Soyadı	Oğuz Kağan TÜREDİ
	Numarası	173351011
	Anabilim Dalı	Veterinerlik Mikrobiyolojisi
	Programı	Veterinerlik Mikrobiyolojisi Doktora Programı
	Program Düzeyi	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora
Tezin Başlığı	Mastitisli Anadolu Mandaları ve Süt İneklerinden <i>Candida</i> Türlerinin İzolasyonu, Moleküler Tiplendirilmesi, Virülens Faktörleri ve Antifungal Dirençliliklerinin Araştırılması	
Tez Savunma Sınav Tarihi	27.12.2023	
Tez Savunma Sınav Saati	11:30	

Yukarıda bilgileri verilen öğrenciye ait tez, Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

27/12/2023

Oğuz Kağan TÜREDİ

ÖZET

Mastitisli Anadolu Mandaları ve Süt İneklerinden *Candida* Türlerinin İzolasyonu, Moleküler Tiplendirilmesi, Virülens Faktörleri ve Antifungal Dirençliliklerinin Araştırılması

Bu Tezde, mastitisli Anadolu mandaları ve süt ineklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu, moleküler düzeyde tiplendirilmesi, *Candida albicans* olarak tanımlanmış izolatlarda aglutinin-benzeri sekans (*ALS1*), salgısal aspartil proteinaz (*SAP1*) ve fosfolipaz enzimi (*PLB1*) virülens genlerinin varlığının araştırılması ve *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılık/dirençlilik profillerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, Afyonkarahisar ili'nde ve ilçelerinde bulunan 301 Anadolu mandasına ait 1188 meme lobu ve 332 sağmal ineğe ait 1321 meme lobu süt örneği kullanıldı. Örneklerden *Candida* türlerinin fenotipik izolasyonunu takiben, şüpheli izolatlar ilk kez bu çalışmada tasarlanan cins-spesifik *ITS* primerleri kullanılarak PZR uygulandı. PZR ile *Candida* olarak belirlenen izolatlar, tek yön Sanger sekans analizi ile tanımlanmış edildi. Anadolu mandası izolatlarının %79,59'u *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*, n=74), %11,82'si *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*, n=11), %4,3'ü *Suomyces xylopsoci* (*Candida xylopsoci*, n=4), %2,15'i *Candida albicans* (n=2), %1,07'si *Candida glabrata* (n=1) ve %1,07'si *Candida rugosa* (n=1) olarak tiplendirildi. Süt ineklerinden izole edilen türlerin ise %54,54'ü *P. kudriavzevii* (*C. krusei*, n=54), %39,4'ü *K. marxianus* (*C. kefir*, n=39), %4,04'ü *C. xylopsoci* (n=4), %1,01'i *Candida parapsilosis* (n=1) ve %1,01'i *C. rugosa* (n=1) olarak tanımlanmış edilirken, süt ineklerinden *C. albicans* tanımlanmış edilemedi. Çalışmada, hem mandalar hem de süt ineklerinden en yüksek oranda izole edilen türler *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) ve *K. marxianus* (*C. kefir*) olarak belirlendi. Çalışmada, Anadolu mandalarından izole edilen iki *C. albicans*'ta *ALS1*, *SAP1* ve *PLB1* genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. Türlerden ikisinin de *SAP1* genini taşıdığı belirlenirken, türlerde *ALS1* ve *PLB1* genleri bulunamadı. Bu Tezde, Anadolu mandaları ve süt ineklerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungal dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Anadolu mandalarından izole edilen türlerin tamamı flusitozine dirençli iken, türlerde

itrakonazol (%98,9; n=92), amfoterisin B (%88,2; n=82), kaspofungin (%86; n=80) ve flukonazole (%83,9; n=78) karşı da yüksek direnç oranları elde edildi. Süt ineklerinden izole edilen 99 türün tamamı itrakonazol ve flusitozine dirençli iken, türlerin 96'sında (%97) amfoterisin B'ye, 75'inde (%75,8) kaspofungine ve 63'ünde flukonazole (%63,6) karşı direnç belirlendi. Manda izolatlarının %90,3'ü vorikonazole ve ketokonazole duyarlıyken, inek izolatlarının %97'si ketokonazole ve %92'si vorikonazole duyarlı bulundu. Sonuç olarak bu tez çalışmasında, örneklenen hayvanlarda mayalara bağlı mastitis etiyolojisinde non-*albicans Candida* türlerinin daha yaygın olduğu gösterildi. *Candida* türlerine karşı mastitis tedavi planlarının belirlenmesinde ve hastalığın etkili bir şekilde kontrol edilmesinde antifungal duyarlılık testlerinin önemli bir yol gösterici olabileceği düşünüldü. Ayrıca, bu tez, Türkiye'de Anadolu mandalarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler yöntemlerle tiplendirildiği ve manda orijinli *C. albicans* izolatlarında *SAP1* virülens geni varlığının gösterildiği ilk araştırmadır. Tez sonucunda elde edilen bulguların, daha sonra konu ile ilgili yapılacak araştırmalar için önemli epidemiyolojik veri kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antifungal ajanlar, Antimikrobiyal direnç, *Candida* spp., İnek, Manda, Mastitis, PZR, Sekans analizi, Tek sağlık, Virülens genleri

SUMMARY

Isolation, Molecular Typing, Detection of Virulence Factors and Antifungal Resistance of *Candida* Species from Anatolian Buffaloes and Dairy Cows with Mastitis

The thesis study aimed to isolate *Candida* species from Anatolian buffaloes and dairy cows with mastitis, their molecular typing, investigate the presence of agglutinin-like sequence (*ALS1*), secreted aspartyl proteinase (*SAP1*) and phospholipase enzyme (*PLB1*) virulence genes in the isolates identified to be *Candida albicans* and determine the antifungal sensitivity/resistance profiles of the *Candida* isolates. In this thesis, 1188 mammary quarter milk samples belong to 301 Anatolian buffaloes and 1321 mammary quarter milk samples belong to 332 dairy cows located in the center and districts of Afyonkarahisar were used. Following the phenotypic isolation of *Candida* species from the samples, PCR was performed on suspected isolates using genus-specific *ITS* primers designed for the first time in this thesis study. The isolates determined to be *Candida* by PCR were identified by single-direction Sanger sequencing analysis. Of Anatolian buffalo isolates, 79.59% *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*, n=74), 11.82% *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefyr*, n=11), 4.3% *Suhomyces xylopsoci* (*Candida xylopsoci*, n=4), 2.15% *Candida albicans* (n=2), 1.07% *Candida glabrata* (n=1) and 1.07% as *Candida rugosa* (n=1) were typed. While of species isolated from dairy cows, 54.54% *P. kudriavzevii* (*C. krusei*, n=54), 39.4% *K. marxianus* (*C. kefyr*, n=39), 4.04% *C. xylopsoci* (n=4), 1.01% *Candida parapsilosis* (n=1) and 1.01% as *C. rugosa* (n=1) were identified, *C. albicans* could not be identified from dairy cows. In this thesis study, the species isolated at the highest rates from both buffaloes and dairy cows were determined to be *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) and *K. marxianus* (*C. kefyr*). The presence of *ALS1*, *SAP1* and *PLB1* genes in two *C. albicans* isolated from Anatolian buffaloes was investigated by PCR in thesis study. While it was determined that both species carried the *SAP1* gene, the *ALS1* and *PLB1* genes were not found in the species. In the thesis study, the antifungal resistances of *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes and dairy cows were investigated using disc diffusion method. While all species isolated from Anatolian buffaloes were resistant to flucytosine, high resistance

rates against to itraconazole (98.9%; n=92), amphotericin B %88.2%; n=82), caspofungin (86%; n=80) and fluconazole (83.9%; n=78) were also obtained in the species.). While all of 99 species isolated from dairy cows were resistant to itraconazole and flucytosine, the resistance was determined to amphotericin B in 96 (97%), to caspofungin in 75 (75.8%) and to fluconazole in 63 (63.6) of species. Buffalo isolates were susceptible to voriconazole and ketoconazole at rates of 90.3%, while 97% were found to be susceptible to ketoconazole and 92% to voriconazole of dairy cow isolates. As a result, it was shown that non-*albicans Candida* species were more common in the yeast-related mastitis etiology in the sampled animals. It was considered that antifungal susceptibility tests may be a significant guide in determining mastitis treatment plans against *Candida* species and effectively controlling the disease. In addition, this is the first thesis study typed by molecular methods the *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes and shown the presence of *SAP1* virulence gene in *C. albicans* isolates of buffalo origin in Turkey. It is thought that the findings obtained in the thesis study may be an important source of epidemiological data for future researches on the subject.

Keywords: Antifungal agents, Antimicrobial resistance, Buffalo, *Candida* spp., Cow, Mastitis, One health, PCR, Sequence analysis, Virulence genes

ÖNSÖZ

Doktora eğitimine başladığım süre boyunca her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Esra ŞEKER'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın geçmiş dönemlerdeki Değerli hocaları Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU'na, Prof. Dr. Beytullah KENAR'a, Öğr. Grv. Zahide KÖSE'ye, tez izleme komitemde bulunan Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erhan ÖZENÇ'e, Bayat MYO Veterinerlik Bölümü'nden Dr. Öğr. Ü. Selahattin KONAK'a çalışmalarında yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Metin ERDOĞAN'a, Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Araş. Grv. Dr. M. Sinan EREZ'e, çiftliklerde süt toplama sürecinde sabahın kör saatinde, çok büyük yardımlarını gördüğüm o zamanlar öğrencim, şimdi meslektaşlarım olan; başta Veteriner Hekim Ece Nur DEMİRAL'a, Veteriner Hekim Deniz KAYA'ya, Veteriner Hekim Mahmut Şaban DEVRİN'e, Veteriner Hekim Salim ÖZTÜRK'e, Veteriner Hekim Furkan ŞAHİN'e, Veteriner Hekim İhsan Can ONAT'a, Veteriner Hekim Mehmet KÖROĞLU'na, Veteriner Hekim Salih AKDAĞ'a, Veteriner Hekim Hatice SAYAN'a, bilgi ve tecrübeleriyle destek olan Uzm. Veteriner Hekim Seydi Mehmet ARSLAN'a, çiftlikleri bulmamda yardımcı olan ismini hatırlayamadığım dostlarıma, meslektaşlarıma, süt örneklerini almama müsaade eden çiftlik sahiplerine, her hafta çiftlikten benim için ayrılan kan aldığım güzel koyuna, eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan AİLE bireylerime ve bugünlere gelmemde sonsuz özveri ve büyük emek sahibi olan sevgili ANNEME, varlığı ile her zaman yanımda olan dert ve sıkıntılarımı paylaştığım, değerli vaktini benimle paylaşan hem kardeşim hem meslektaşım Veteriner Hekim Alparslan Mutluhan TÜREDİ'ye, akademik anlamda beni anlayan, yol gösteren, dinleyen Halam A. Tülay BALCI'ya ve tabi en çok da hayatını benimle paylaşan, hayallerini erteleyen, iyi günde kötü günde kolay ve zor anlarımda hep yanımda olan sevgili eşim Kevser YALDIZ TÜREDİ'ye tez çalışmamı maddi olarak destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Saygılarımla
Oğuz Kağan TÜREDİ
Afyonkarahisar
2023

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
SUMMARY	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER	xii
ÇİZELGELER	xiii
FOTOĞRAFLAR	xv
GRAFİKLER	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikolojinin Tarihçesi	2
1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler	3
1.3. <i>Candida</i> ’lar Hakkında Genel Bilgiler	9
1.3.1. <i>Candida</i> Türlerinin Mikroskopik ve Makroskopik Morfolojisi	11
1.3.2. <i>Candida</i> Türlerinin Hücre Yapısı	13
1.3.2.1. Hücre İskeleti	13
1.3.2.2. Hücre Duvarı	14
1.3.2.3. Hücre Membranı	15
1.3.2.4. Hücre Sitoplazması	16
1.3.3. <i>Candida</i> Türlerinin Virülens Faktörleri	17
1.3.3.1. Adhezyon	18
1.3.3.2. Morfogenezis (Morfolojik değişim, Dimorfizm)	21
1.3.3.3. Fenotipik Değişim	22
1.3.3.4. Biyofilm Oluşumu	23
1.3.3.5. Enzimler	25
1.3.3.5.1. Salgısal Aspartil Proteinazlar	26
1.3.3.5.2. Fosfolipazlar	27
1.3.3.5.3. Lipazlar ve Estrazlar	28
1.4. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji ve Patogenez	29
1.5. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında İmmunolojik Savunma	32

1.6. <i>Candida</i> Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar	34
1.6.1. İnsanlarda <i>Candida</i> Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar	34
1.6.2. Hayvanlarda <i>Candida</i> Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar	36
1.7. <i>Candida</i> Türlerinin Laboratuvar Tanı Yöntemleri	39
1.7.1. Mikolojik Tanı Yöntemleri	40
1.7.1.1. Direkt Mikroskopi	40
1.7.1.2. Kültür	40
1.7.1.3. Boyama	42
1.7.1.4. Blastokonidya, Hifa, Psödohifa ve Klamidospor Oluşumu	42
1.7.1.5. Germ Tüp Oluşumu	44
1.7.1.6. Biyokimyasal Testler	46
1.7.1.6.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	46
1.7.1.6.2. Nitrat Testi	47
1.7.1.6.3. Hızlı Üreaz Testi	47
1.7.1.6.4. Hızlı Trehaloz Testi	48
1.7.1.6.5. Tuz Toleransı Testi	48
1.7.1.6.6. Isı Toleransı Testi	49
1.7.1.6.7. Hızlı Test Kitleri ile Tanı	49
1.7.2. Moleküler Tanı Yöntemleri	51
1.7.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	52
1.7.2.2. Konvansiyonel PZR (Conventional PCR)	53
1.7.2.3. Multipleks (Çoklu) PZR	54
1.7.2.4. Yuvalanmış PZR (Nested PCR)	55
1.7.2.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PCR)	55
1.7.2.6. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis, HRM)	56
1.7.2.7. DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi) ve Filogenetik Analiz	57
1.8. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonların Sağaltımında Antifungal Ajanlar	59
1.8.1. Hücre Duvarına Etkili Ajanlar	60
1.8.1.1. Ekinokandinler	60
1.8.2. Hücre Membranına Etkili Ajanlar	60
1.8.2.1. Polyen Grubu Antifungal Ajanlar	60

1.8.2.2. Azol Grubu Antifungal Ajanlar	61
1.8.3. Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Ajanlar	63
1.8.3.1. Nükleozid Analogları	63
1.9. Süt İnekleri ve Anadolu Mandalarında Mastitis	64
1.10. Mastitis Sınıflandırması	66
1.10.1. Etkenlere Göre Mastitis Sınıflandırması	67
1.10.1.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Mastitis Etkenleri	67
1.10.1.2. Fırsatçı (Oportünistik) Mastitis Etkenleri	67
1.10.1.3. Çevresel Mastitis Etkenleri	68
1.10.2. Klinik Semptomlarına Göre Mastitis Sınıflandırması	68
1.10.2.1 Klinik Mastitis	68
1.10.2.2 Subklinik Mastitis	69
1.11. Mayalara Bağlı Mastitisler	70
1.12. California Mastitis Test (CMT)	70
2. MATERYAL VE METOT	72
2.1. Materyal	72
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvanların Seçimi ve Süt Örnekleri	72
2.1.2. Standart Suşlar	73
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	73
2.1.3.1. Sabouraud %2 Dekstroz Broth	73
2.1.3.2. Sabouraud %4 Dekstroz Agar	74
2.1.3.3. <i>Candida</i> Chromogenic Agar	74
2.1.3.4. Tween 80 İlaveli Corn Meal Agar	75
2.1.3.5. Tryptic Soy Agar	75
2.1.3.6. Mueller Hinton Agar	75
2.1.3.7. Tryptic Soy Broth	76
2.1.4. Boyalar	76
2.1.5. Tavşan plazması	77
2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler	77
2.1.6.1. Primerler	77
2.1.6.2. Tris-HCl/Borik Asit/EDTA (TBE) Buffer	78
2.1.6.3. Agaroz Jel	78

2.1.6.4. Gel Loading Dye	79
2.1.7. Marker	79
2.1.8. Cihazlar	79
2.2. Metot	80
2.2.1. <i>Candida</i> Türlerinin İzolasyonu	80
2.2.1.1. Örneklerden SDB ve SDA Besiyerlerine Ekim ve Gram Boyama	80
2.2.1.2. <i>Candida</i> Kromejenik Ağara Ekim	80
2.2.1.3. Germ Tüp Testi ve Klamidospor Oluşumu	80
2.2.2. Moleküler İdentifikasyon	81
2.2.2.1. <i>Candida</i> İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Cins Düzeyinde İdentifikasyonu	81
2.2.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu	81
2.2.2.1.2. Ekstrakte Edilen DNA'ların Miktar ve Safılık Kontrolü	82
2.2.2.1.3. Amplifikasyon Koşulları	83
2.2.2.2. <i>Candida</i> İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu	84
2.2.2.2.1. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz	84
2.2.2.3. <i>C. albicans</i> 'ın Virülens Genlerinin Araştırılması	85
2.2.3. Antifungal Duyarlılık Testi	86
3. BULGULAR	88
3.1. İzolasyon Bulguları	88
3.2. Moleküler İdentifikasyon Bulguları	92
3.3. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz	95
3.4. Sonuçların Karşılaştırılması	98
3.5. <i>C. albicans</i> 'ın Virülens Faktörlerine Ait Bulgular	99
3.6. Antifungal Duyarlılık Testi Bulguları	101
4. TARTIŞMA	104
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	118
6. KAYNAKLAR	121

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α : Alfa

ALS: Aglutinin-benzeri sekans

ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

β : Beta

CHS: Kitin sentez geni

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECE: Hücre uzama derecesini kodlayan gen

EFG: Filamentöz büyümeyi geliştiren gen

EPA: Epitelyal adhezyon proteinleri

EPD: Psödohifal gelişim geni

EPS: Hücre dışı polimerik maddeler

g: Gram

HWP: Hifal duvar proteini

IFN γ : İnterferon gama

IL: İnterlökin

INT: İntegrin

ITS: Kopyalanmış aralayıcı bölge

KOH: Potasyum hidroksit

L: Litre

LIP: Lipaz geni

MAPK: Mitojen ile aktive olan protein kinaz

μ g: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µM: Mikromolar

mg: Milligram

mM: Milimolar

MNT: Mannoziltransferaz

NAC: non-*albicans Candida*

PAMP: Patojen ilişkili moleküler yapılar

PHR: pH düzenleme genini

PLB: Fosfolipaz B geni

pmol: Pikomol

PMT: Protein mannoziltransferaz

PRA: pH'yı düzenleyici antijen geni

PRR: Patern tanıyıcı reseptörler

rDNA: ribozomal Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

°C: Santigrat derece

SAP: Salgısal aspartil proteinaz

SHS: Somatik hücre sayısı

TGF: Dönüştürücü büyüme faktörü

Th: Yardımcı T lenfosit

TLR: Toll-benzeri reseptör

TNF-α: Tümör nekrozis faktör alfa

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 1.1: <i>C. albicans</i>	5
Şekil 1.2: Aseksüel spor tipleri	8
Şekil 1.3: <i>C. albicans</i> 'ın maya ve filamentöz morfolojileri	13
Şekil 1.4: <i>C. albicans</i> 'ın hücre duvarı bileşenleri ve yapısal organizasyonu	15
Şekil 1.5: Tipik bir <i>ALS</i> geninin şematik gösterimi	19
Şekil 1.6: <i>C. albicans</i> 'ın <i>ALS</i> gen ailesinin yapısı	19
Şekil 1.7: <i>C. albicans</i> 'ın <i>ALS</i> gen ailesinin içinde bulunan farklı sekansların insan biçiminde sunumu	20
Şekil 1.8: Biyofilm oluşumunun sırasıyla gösterimi	23
Şekil 1.9: <i>C. albicans</i> 'a ait <i>SAP</i> virülens gen ailesinin dizi homolojisiyle gruplarının gösterilmesi	26
Şekil 1.10: <i>C. albicans</i> 'ta blastokonidyum çizimi	43
Şekil 1.11: <i>C. albicans</i> 'ta germ tüp oluşumu çizimi	45
Şekil 1.12: Fungal rDNA'nın yapısı ve evrensel primerlerin şematik diyagramı	53
Şekil 1.13: Antifungallerin etki şekillerinin hücre üstünde gösterimi	63

ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1: Mantarlar ve bakterilerin karşılaştırılması	7
Çizelge 1.2: <i>Candida</i> türlerinin güncel taksonomisi	10
Çizelge 1.3: <i>Candida</i> türlerinin güncel olarak isimlendirilmeleri	10
Çizelge 1.4: Patojen <i>Candida</i> spp.'lerin morfolojik yapıları	12
Çizelge 1.5: İnsanlarda bazı kandidiyazis vaka raporları	35
Çizelge 1.6: Hayvanlarda kandidiyazis seçilmiş bazı vaka raporları	37
Çizelge 1.6: Devam	38
Çizelge 1.7: Tween 80 ilaveli mısır unlu agarda üretilen bazı <i>Candida</i> türlerinin mikroskopik morfolojik özellikleri	44
Çizelge 1.8: Bazı <i>Candida</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat asimilasyon testleri ve değerlendirilmeleri	47
Çizelge 1.9: Evrensel fungal primerler	54
Çizelge 1.10: Filogenetik ağaç yöntemlerinin sınıflandırılması	59
Çizelge 1.11: <i>Candida</i> infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal etken maddeler ve etki mekanizmaları	64
Çizelge 2.1. Örneklenen hayvanların örneklemenin yapıldığı yerlere göre dağılımı	72
Çizelge 2.2: Sabouraud dekstroza broth içeriği	73
Çizelge 2.3: Sabouraud dekstroza agar içeriği	74
Çizelge 2.4: Supplement içeriği	74
Çizelge 2.5: <i>Candida</i> chromogenic agar içeriği	74
Çizelge 2.6: Corn meal agar içeriği	75
Çizelge 2.7: Tryptic soy agar içeriği	75
Çizelge 2.8: Mueller Hinton agar içeriği	76
Çizelge 2.9: Tryptic soy broth içeriği	76
Çizelge 2.10: Gram boyama seti içeriği	76
Çizelge 2.11: ITS bölgesi ve virülens genlerini hedef alan primer dizileri	77
Çizelge 2.12: 10X TBE solüsyonu içeriği	78
Çizelge 2.13: 0,5X TBE kullanma solüsyonu içeriği	78
Çizelge 2.14: Agaroz jel içeriği	78
Çizelge 2.15: ITS bölgesini hedef alan primer dizileri ve bant uzunluğu	83

Çizelge 2.16: PZR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarlar	84
Çizelge 2.17: PZR işleminde kullanılan amplifikasyon koşulları	84
Çizelge 2.18: Virülens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları ve beklenen baz büyüklükleri	85
Çizelge 2.19: PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları	86
Çizelge 2.20: PZR işleminde kullanılan amplifikasyon koşulları	86
Çizelge 3.1: Anadolu Mandalarından izole edilen <i>Candida</i> izolatlarının CMT skorlamasına göre dağılımı	88
Çizelge 3.2: Süt ineklerinden izole edilen <i>Candida</i> izolatlarının CMT skorlamasına göre dağılımı	89
Çizelge 3.3: Anadolu mandalarından identifiye edilen <i>Candida</i> türleri ve izolasyon oranları	95
Çizelge 3.4: Süt ineklerinden identifiye edilen <i>Candida</i> türleri ve izolasyon oranları	95
Çizelge 3.5: Anadolu Mandası izolatlarının izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması	99
Çizelge 3.6: İnek izolatlarının izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması	100
Çizelge 3.7: Anadolu mandalarından izole edilen türlerin antifungal ajanlara karşı dirençliliklikleri	102
Çizelge 3.8: Süt ineklerinden izole edilen türlerin antifungal ajanlara karşı dirençliliklikleri	103

FOTOĞRAFLAR

SAYFA

Fotoğraf 1.1: <i>C. albicans</i> 'ın Elektron Mikroskobu ile biyofilm analizi	24
Fotoğraf 1.2: Serum örneklerinde <i>C. albicans</i> 'ın boyamasız germ tüp tespiti	46
Fotoğraf 2.1: DNA saflık kontrolü için jel elektroforez görüntüsü	83
Fotoğraf 3.1: İzolatların CCA'da makroskobik morfolojisi.	90
Fotoğraf 3.2: Mandalardan izole edilen <i>C. albicans</i> şüpheli izolatın germ tüp görüntüsü	91
Fotoğraf 3.3: Mandalardan izole edilen <i>C. albicans</i> şüpheli izolatın klamidospore oluşumu görüntüsü	91
Fotoğraf 3.4: Anadolu mandalarına ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri	93
Fotoğraf 3.5: Süt ineklerine ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri	94
Fotoğraf 3.6: <i>C. albicans</i> 'ta <i>SAP1</i> geni varlığına ait PZR bulguları	100
Fotoğraf 3.7: <i>C. albicans</i> 'ta <i>ALS1</i> genini belirlemeye yönelik PZR bulguları	100
Fotoğraf 3.8: <i>C. albicans</i> 'ta <i>PLB1</i> genini belirlemeye yönelik PZR bulguları	101

GRAFİKLER

SAYFA

Grafik 3.1: Anadolu mandalarından identifiye edilen <i>Candida</i> türlerinin % grafik görünümü	96
Grafik 3.2: Süt ineklerinden identifiye edilen <i>Candida</i> türlerinin % grafik görünümü	96
Grafik 3.3: Anadolu mandaları ve süt ineklerinden identifiye edilen <i>Candida</i> spp. taksonlarının evrimsel ilişkileri	97



1. GİRİŞ

Çekirdekleri gelişmiş özellikte olan ökaryotik mikroorganizmalar grubunda yer alan, doğada tek hücreli veya çok hücreli olarak bulunan mantarlar genel olarak "fungus" başlığı altında toplanmaktadır. Mantarlar arasında küf mantarları çok hücreli ökaryotik mikroorganizmalar grubunda yer alırken, *Candida* türlerini içeren mayalar ise tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir (Madigan ve Martinko, 2006; Drouhet, 2010; Özgüven, 2019).

Mastitis, süt endüstrisinde sıkça rastlanan ve karmaşık etiyolojiye sahip olan bir hastalıktır. Süt hayvanlarında yaygın olarak görülen bu hastalık üretilen sütün maliyetini artırırken, miktarında ve kalitesinde bozulmaya yol açmaktadır (Özyurtlu 2011; Gökalp, 2021). Literatür verilerine göre, süt hayvanlarında meydana gelen mastitis vakalarının %2-13'ü mantar infeksiyonlarından oluşmaktadır. İneklerde mikotik mastitis etiyolojisinde en yaygın karşılaşılan mantar türleri; *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp. (özellikle *Cryptococcus neoformans*), *Penicillium* spp., *Rhodotorula* spp. ve *Geotrichum candidum*'dur (Ahmed vd., 2013; Ksouri vd., 2015; Ibrahim vd., 2019; Morales-Ubaldo vd., 2023). Mikotik mastitis, mastitis tedavisinde kontrolsüz antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak giderek daha yaygın bir sorun haline gelmektedir. Bununla birlikte, konakçı, etken ve çevresel faktörler, mastitisin ortaya çıkmasına katkıda bulunur (Dubie vd., 2015). Sporadik olarak ortaya çıkan mikotik mastitis vakaları, kontamine meme içi uygulamalar veya yoğun çevresel kontaminasyon sonucunda da meydana gelebilir (Elad vd., 1995; Krukowski ve Saba, 2003). *Candida* türlerine bağlı sporadik ve fırsatçı infeksiyonlar genellikle immünosupresyon durumu veya antimikrobiyal ilaçların uzun süreli kullanımıyla ilişkilidir. Hayvanlarda normalde flora üyesi olan *Candida* türlerinin aşırı artması, hayvanların sindirim sistemlerini veya ürogenital sistemlerini de etkiler. Taylarda antibiyotik tedavisinin mikrobiyotada değişikliklere neden olması sonucunda mikotik enterit vakaları (Preis vd., 2012), ineklerde *Candida* türlerinin neden olduğu abortlar ve mastitis vakaları bildirilmiştir (Cabañes, 2010; Da Costa vd., 2012; Eldesouky vd., 2016; Kurt ve Ekşi, 2021; Yüksel Dolgun vd., 2022; Awandkar vd., 2023).

1.1. Mikolojinin Tarihçesi

Mantarların varlığının çok eski zamanlara kadar uzandığı, MÖ. 1200'lü yıllara kadar bitkiler üzerinde mantarların ürediği ve bazı zararlara neden olduğu bilinmektedir. Romalılar döneminde, depolarda saklanan danelerde ve tahıllarda mantarların üretildiği rapor edilmiştir. Aynı dönemlerde Pompei'deki kazılarda mantarlarla ilgili bazı resimler çizilmiştir (Arda, 2015). Mantar infeksiyonlarına dair en eski belge, Hindu kutsal metinlerinden biri olan Sambita'da bulunmakta olup, bu belge ayakta misetomadan bahseder. Eski dönemlerdeki belgelerden biri de, Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından ağızda Kandidiyaz olarak bilinen aft infeksiyonunun tanımlandığı belgedir. Ayrıca Roma ansiklopedisti Aulus Cornelius Celsus tarafından "De Re Medicina" eserinde dermatofitozun ilk tanımı yapılmış ve yangılı Ringworm, ağızda Kandidiyaz gibi infeksiyonlardan bahsedilmiştir (Yücel, 1999; Samanta, 2015). 'Mikoloji' terimi Berkley tarafından mantarlarla ilgili bir çalışma olarak ortaya atılmıştır. Polonyalı doktor Robert Remak, 1837-1841 yılları arasında ilk insan mikozisini tanımlamıştır (Samanta, 2015). Robin tarafından 1853 yılında, *Candida albicans* hastaların pamukçuk lezyonlarında incelenmiş ve etkenin basit kültürü yapılmıştır (Yücel, 1999). Literatürde, *C. albicans* farklı isimlerle adlandırılmıştır. Rubin 1843'te bu organizmayı "*Oidium albicans*", Zopf 1890'de "*Monilia albicans*" ve en son olarak Berkhout 1923 yılında "*Candida albicans*" olarak adlandırmıştır (Tümbay, 1999; Asan, 2007). Günümüzde yaklaşık olarak 200 *Candida* türü bilinmektedir. Bu cins içinde en sık karşılaşılan patojen tür *C. albicans* olarak kabul edilmektedir. Diğer yaygın türler arasında *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ve *Candida guilliermondii* bulunur (Hazen vd., 2003). Tıbbi Mikolojiye önemli katkılarda bulunan ve medikal mikolojinin öncülerinden biri olarak kabul edilen Raymond Sabouraud, 1910 yılında dermatofitler üzerine kapsamlı bir çalışma olan "Les Teignes" adlı kitabı yayımlamıştır. Mantarların üretilmesi için kullanılan besiyerleri de, Sabouraud'un anısına "Sabouraud glukoz (dekstroz) agar" olarak adlandırılmaktadır (Odds, 1991; Yücel, 1999). Mantarların mikroskop altında incelenebilmesi için; Gomori 1946'da boyama yöntemi geliştiren ilk kişidir. Bu yöntem daha sonra 1955'te Grocott tarafından modifiye edilmiştir. Kligman tarafından 1951'de, mantarların histopatolojik olarak gösterilmesi için Periodik Asit Schiff (PAS) boyasını kullanılmıştır. Gridley 1953 yılında PAS boyasındaki periodik

asidi kromik asit ile değiştirerek, dokularda hem hifaların hem de maya hücrelerinin mikroskopik olarak görüntülenmesini sağlamıştır (Samanta, 2015).

Türkiye'de Osmanlı döneminde Celalettin Muhtar'ın 1892'de el ve ayak dermatofitleri hakkındaki ilk makalesi, Talad'ın 1908'de Favus konusundaki bilimsel yayınları, Englaender'in 1916'daki onikomikoz yayınları ve Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat'ın Türkiye'deki dermatofit listesini hazırlaması mikoloji alanında anlamlı ve değerli katkılar olarak kabul edilir (Yücel, 1999; Hilmioğlu-Polat vd., 2019). İnsanlarda ilk Histoplazmoz olgusu, Dr. Tevfik Sağlam tarafından 1945 yılında rapor edilirken, Türkiye'nin ve dünyanın ilk kedi Histoplazmoz olgusu, Veteriner Hekim Reşat S. Akün tarafından 1949 yılında bildirilmiştir. Dr. Ayhan Yücel ve Kantarcıoğlu Türkiye'de ilk kez 1989 yılında çevresel örneklerden *Histoplasma capsulatum*'u izole etmeyi başarmışlardır (Turhan, 2009). Türkiye'de mikoloji biliminin gelişimine büyük katkılarda bulunmuş birçok değerli bilim insanı bulunmaktadır. Tıbbi mikoloji alanında; Prof. Dr. Emel Tümbay, Prof. Dr. Nizamettin Erbakan, Prof. Dr. Lütfi Tat, Prof. Dr. Cemal Gezen, Prof. Dr. Reşat T. Kınacıgil, Prof. Dr. Nevzat Öke, Prof. Dr. Behiç Onul, Prof. Dr. Namık Aksoycan, Prof. Dr. Enver Tali Çetin, Prof. Dr. Özdem Anę, Prof. Dr. Ömer Kasımoğlu, Prof. Dr. Ayhan Yücel, Prof. Dr. Nuran Yuluğ gibi önemli bilim insanlarını bulunurken, Veteriner Mikolojinin kurucusu Prof. Dr. Mustafa Arda önemli çalışmalar yapmış ve mikoloji bilimine katkı sağlamıştır (Yücel, 1999).

1.2. Mantarlar Hakkında Genel Bilgiler

Mantar terimi, Latince'deki "*Fungus*" kelimesinden türetilmiştir. Bu kelime Latince'ye Yunanca "*sphongirs*" veya "*spongae*" ifadelerinden geçmiştir (Drouhet, 2010). Mantarlar aleminde yaklaşık 1 500 000 tür olduğu tahmin edilmekte olup, bu türlerin 80 000'den fazlası tanımlanmıştır. Bununla birlikte, yaklaşık 400 mantar türü insanlarda hastalığa neden olma eğilimindedir (Quinn vd., 2011). Mantarlar, mikroskopik olarak tek hücreli mayalardan, çok hücreli küflere kadar farklı formlarda değişen, aerofilik ökaryotik, heterotrof, spor içeren, hareketsiz saprofitlerdir (Baron, 1996). Geniş yayılım alanlarıyla bilinen mantarlar, kuru ve nemli alanlar ile tropik bölgelerden ılıman iklimlere, çöllerden derin denizlere kadar neredeyse her türlü yaşam alanında bulunabilirler (Wang vd., 2017). Eşeyli (seksüel) ve/veya eşeysiz (aseksüel) yollarla

çoğalabilen mantarların karakteristik ve eşsiz özelliği sert bir hücre duvarı varlığıdır. Esas olarak kitin ve glukanlardan oluşan hücre duvarı, antibakteriyel bileşikler de dahil olmak üzere birçok maddeye karşı mantarları geçilmez hale getirir (Garcia-Rubio vd., 2020). Besinlerini ekzoenzimler üreterek dışarıda parçalayan ve ardından absorpsiyon yoluyla elde eden ökaryotik mantarlar, fotosentez yapmayan heterotrof mantarlar arasında yer alır ve bu grupta yaklaşık 400 mantar türü, hayvanlar için patojen olarak kabul edilmektedir (Quinn vd., 2011).

Mantar aleminin taksonomisi, yeni DNA karşılaştırmalarına dayanan son araştırmaların etkisiyle sürekli olarak güncellenmektedir. Geleneksel yaklaşım ise sınıflandırmayı morfolojik farklılıklara, fizyolojiye, yapısal makro moleküllerin varlığına ve seksüel aktiviteye dayandırmaktadır (Quinn vd., 2011; Mora-Montes ve Lopes-Bezerra, 2017).

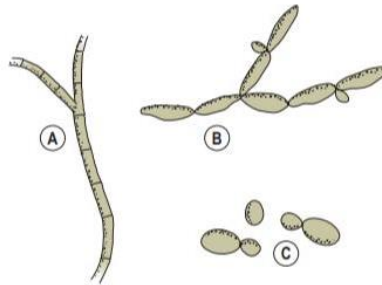
Mantarlar, morfolojilerine göre filamentöz bir koloni morfolojisine sahip küfler ve mukoid bir üreme gösteren mayalar olmak üzere genel olarak iki gruba ayrılırlar. Mayalar ve küflerin dışında kalanlar ise ara form olan dimorfik mantarlar grubunda sınıflandırılırlar (Arda, 2015; Gorthi, 2019; Gülmez ve Alp, 2021).

1. Küfler: Eşeyli (seksüel) veya eşeysiz (aseksüel) üreme biçimlerine bağlı olarak karmaşık yapılar sergileyen filamentöz, çok hücreli formlara sahiptirler. Küflerin temel yapı birimi, septum ile bölmelenmiş (septumlu) (Ascomycetes sınıfı) veya bölmelenmemiş (septumsuz) (Zygomycetes ve Oomycetes sınıfı), genellikle ince, uzun ve saydam, ipliksi bir yapı olan hifalardır (Butterfield, 2009). Dallanmış hifaların oluşturduğu ağ benzeri yapı ise miselyum olarak bilinir ve bu yapı mantarın vejetatif gövdesini oluşturur. Aseksüel olarak üreyen mantarlar, vejetatif misellerden konidyoforlar olarak ortaya çıkan ve sonunda konidya oluşturan cisimler meydana getirir. Konidyanın yapısı ve organizasyonu, birçok küfün morfolojik olarak tanımlanması için faydalı araçlardır. Seksüel olarak üreyen mantarlar, tümü mantarların morfolojik tanımlanmasına yardımcı olan, çeşitli isimlerle belirtilen ek spor keseleri üretirler. Küfler Ascomycota ve Basidiomycota bölümleri altında sınıflandırılırlar. Tıbbi

açından önemli mantarların çoğu, birkaç istisna dışında Ascomycota bölümüne aittir (De Vries vd., 2017).

2. Mayalar: Tek hücreden lateral tomurcuklanma (blastospor, blastokonidya) ile aseksüel olarak üreyen (seksüel olarak üreyen türler hariç) tek hücreli mantar formlarıdır. *Candida* türlerinde tomurcuklanma sırasında ana hücrenin bir bölümünün uzamasıyla oluşan yapıya blastospor ismi verilir. *Candida albicans* gibi fırsatçı maya türleri filamentöz üreme de gösterebilirler (Chaffin vd., 1998). Bu türler, hücreden hücreye yalancı hifa (Psödohifa, Pseudohypha) oluştururlar. Blastosporların ana hücreden kopmadan uzayarak oluşturdukları hücre zinciri şeklinde de tanımlanabilen psödohifalar, iki hücrenin birleştiği yerde bir daralmanın varlığı ve daralmış noktadan dallanmanın varlığı ile gerçek hifadan ayrılır. Duvarları birbirine paralel olmayıp, hücreler arasında daralmalar oluşması nedeniyle, psödohifalar boğumlu olarak görülürler. Yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz görünümde bir yapı oluşturur (Chaffin vd., 1998; Steinberg vd., 2017). Maya hücresinden veya hifanın bir dalından oluşabilen gerçek hifalar ise, duvarları birbirine paralel, septumlu, boğumlanma göstermeyen, düzgün kenarlı yapılardır (Markey vd., 2013).

3. Dimorfik mantarlar: Yukarıdaki iki geniş kategorinin dışında, insan ve hayvan dokuları ile bazı özel ortamlarda 37 °C sıcaklıkta maya formunda bulunabilen, ancak oda sıcaklığındaki dış ortamlarda küf olarak varlığını sürdüren belirli mantarlar, fenotipik açıdan dimorfik mantarlar olarak gruplandırılırlar (Mora-Montes ve Lopes-Bezerra 2017).



Şekil 1.1: *C. albicans*. A: Hifa, B: Psödohifa, C: Tomurcuklanan maya hücresi (Markey vd., 2013)

Mantarların (mayalar ve küfler) ökaryotik, bakterilerin ise prokaryotik organizmalar olmaları nedeniyle, mantarlar ve bakteriler birkaç temel açıdan farklılık gösterirler. Mantarların temel hücre yapıları; çekirdek, çekirdekçik, sitoplazma, sitoplazma içi granüller, mitokondriya, golgi aygıtı, 80S yapısında ribozom, endoplazmik retikulum, hücre membranı ve hücre duvarından oluşmaktadır. *Cryptococcus* spp. gibi bazı maya tipi mantarların hücre duvarının dışında ayrıca polisakkarit yapıda bir kapsül bulunur (Money, 2016; Casadevall vd., 2019). Mantar hücre duvarı bakterilerde olduğu gibi peptidoglikan tabakadan değil, kalınlığı 0,06 µm olan çok katlı kitinden oluşur. Bu nedenle mantarlar peptidoglikan sentezini inhibe eden penisilinler ve sefalosporinler gibi belirli antibiyotiklere karşı duyarsızdır. Kitin, uzun N-asetilglukozamin (NAGA) zincirlerinden oluşan bir polisakkarittir. Mantar hücre duvarı, bir D-Glukoz polimeri olan β-glukan ve diğer polisakkaritleri de içerir. β-glukanın tıbbi önemi, antifungal bir ilaç olan kaspofunginin etki bölgesi olmasıdır. Mantar hücre membranı ise, kolesterol içeren insan ve hayvan hücre zarının aksine ergosterol ve zimosterol içerir. Amfoterisin B, flukonazol ve ketokonazol gibi azol grubu antifungal ilaçların mantarlar üzerindeki etkisi, mantar hücre membranında bulunan steroller arasındaki farklılığa dayanmaktadır (Levinson, 2014).

Mantarların doğada farklı koşullarda farklı formda ve özellikte bulunabilme yetenekleri dimorfizm olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, maya formundan küf formuna veya küf formundan maya formuna dönüşüm farklı ortam ve farklı sıcaklıklara göre şekillenir. Bu türler, ortam sıcaklığında küf olarak, canlı dokular ve zenginleştirilmiş besiyerlerinde vücut sıcaklığında ise maya formunda bulunurlar (Mora-Montes ve Lopes-Bezerra, 2017). Bu genellemeden farklı olarak *Candida* türleri; canlı dokularda 37 °C’de küf formunda ürerken, doğada 24 °C ortam ısısında maya formunda gelişim gösterirler. *Candida* türlerinin dokularda 37 °C’de küf şeklinde üremesi, etkenlerin fırsatçı patojen olması ile ilişkilendirilmektedir. Farklı sıcaklıklarda farklı yapı ve formlar oluşturan bu mantarlar, termal dimorfik mantarlar olarak tanımlanırlar (Samanta, 2015).

Mantarlar genellikle zorunlu aerofilik organizmalardır. Bazı türler ise fakültatif anaerofilik olabilirken, hiçbir mantar türü zorunlu anaerofilik değildir. Bütün mantarlar

metabolizmaları için önceden var olan bir organik karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle çoğu mantarların doğal yaşam alanı çevredir. Mantarlar ve bakterilerin bazı özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Levinson, 2014).

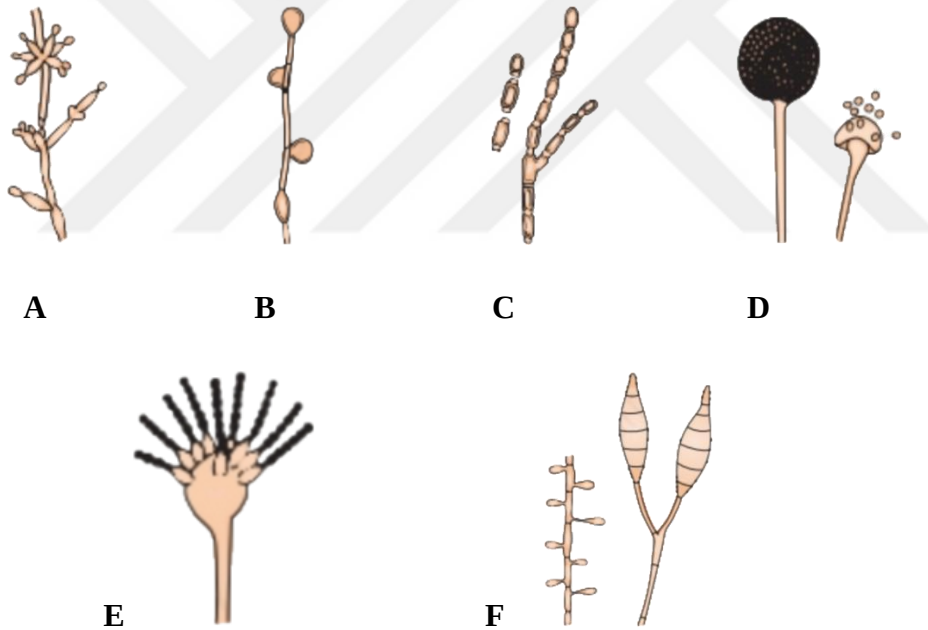
Çizelge 1.1: Mantarlar ve bakterilerin karşılaştırılması (Levinson, 2014)

Özellik	Mantar	Bakteri
Çap	Yaklaşık olarak 4 µm (<i>Candida</i> spp.)	Yaklaşık olarak 1µm (<i>Staphylococcus</i> spp.)
Çekirdek	Ökaryotik	Prokaryotik
Sitoplazma	İçerisinde mitokondri ve endoplazmik retikulum bulunur.	İçerisinde mitokondri ve endoplazmik retikulum bulunmaz.
Hücre membranı	Sterol (ergosterol ve zimosterol) içerir.	Sterol içermez. (<i>Mycoplasma</i> hariç)
Hücre duvarı içeriği	Kitin	Peptidoglikan
Spor	Üreme için seksüel ve aseksüel sporlar vardır.	Bazı bakterilerde, bakterinin hayatta kalması için endospor vardır (bu sporun bakterilerin üremesi ile ilgisi yoktur).
Termal dimorfizm	Var (bazıları)	Yok
Metabolizma	Yaşamak için organik karbona ihtiyaç duyar. Zorunlu anaerofilik özellik göstermezler.	Organik karbona ihtiyaç duymadan yaşayabilir. Bazı bakteri türleri zorunlu anaerofilik özelliktedir.

Doğada seksüel ve aseksüel olarak üreyebilen mantarlardan bazıları her iki formda da üreyebilmekte ve bu mantarlar “Fungi perfecti” olarak tanımlanmaktadır. Seksüel sporlar oluşturmayan mantarlar ise “Fungi imperfecti” olarak isimlendirilmekte ve imperfect mantarlar (kusurlu mantarlar) olarak sınıflandırılmaktadır (Dyer ve Kück, 2017). Tıbbi açıdan önemli pek çok mantar türü, özel yapılarının kenarlarından veya uçlarından aseksüel sporlar oluşturarak çoğalırlar. Bu aseksüel sporların şekli, rengi ve düzeni, mantarların tanımlanmasına katkı sağlar (Levinson, 2014).

Bazı önemli aseksüel spor tipleri aşağıda verilmiştir:

1. Artrosporlar: Hifa uçlarının parçalanmasıyla ortaya çıkan aseksüel spor tipidir (*Coccidioides immitis*).
2. Klamidosporlar: Yuvarlak, kalın duvarlı ve oldukça dirençli olan aseksüel spor tipidir (*C. albicans*).
3. Blastosporlar: Mayaların eşeysiz olarak çoğaldığı tomurcuklanma süreciyle oluşan aseksüel spor tipidir. Bazı mayalar, örneğin *C. albicans*, birbirinden ayrılmayan çoklu tomurcuklar oluşturabilir ve böylece tanımlama için kullanılabilecek yalancı hifa denilen psödohifa üretebilirler.
4. Sporangiosporlar: Bu aseksüel spor tipi *Rhizopus* ve *Mucor* gibi küfler tarafından özel yapıların içinde oluşturulur (Levinson, 2014; Samanta, 2015).



Şekil 1.2: Aseksüel spor tipleri. A: Blastokonidya (Blastoconidia) ve psödohifa (*Candida* spp.), B: Klamidosporlar (*Candida* spp.), C: Artrosporlar (*Coccidioides* spp.), D: Sporangia ve sporangiosporlar (*Mucor* spp.), E: Mikrokonidya (Microconidia) (*Aspergillus* spp.), F: Mikrokonidya ve makrokonidya (macroconidia) (*Microsporum* spp.) (Levinson, 2014)

1.3. *Candida*'lar Hakkında Genel Bilgiler

Mantar alemi Veteriner Hekimlik de dahil olmak üzere, tıbbi önem taşıyanlar olarak altı bölüme ayrılmıştır. Bunlar; Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Microsporidiomycota, Chytridiomycota ve Glomeromycota bölümleridir (Markey vd., 2013; Naranjo-Ortiz ve Gabaldón, 2019). Ascomycota bölümü, Saccharomycetales takımında bulunan mayalar, çevrede yaygın olarak bulunan ve genellikle bitkiler veya bitki materyalleri ile ilişkilendirilen türlerdir. Ayrıca bu etkenler, insan ve hayvanların deri ve mukoz membranlarında kommensal flora üyesi olarak da bulunurlar. Bazı türler, immunsupresyona neden olarak veya mukozal yüzeylerdeki doğal floranın dengesini bozup antimikrobiyal tedaviyi baskılayarak fırsatçı infeksiyonlara yol açabilirler (Markey vd., 2013; Spampinato ve Leonardi, 2013; Fernandes vd., 2016; Vila vd., 2020). Ökaryotik tek hücreli mantarlar olarak bilinen mayalar, endüstri, çevre ve tıp alanlarında önemli işlevlere de sahiptirler (Maicas, 2020).

Mayalar, genellikle tek hücreden lateral tomurcuklanma ve bazen bölünme yoluyla aseksüel olarak üreyen, vejetatif hücrede spor oluşturmeyen tek hücreli mantarlar olarak sınıflandırılırlar (Walker, 2009). Bununla birlikte, son yıllarda çeşitli *Candida* türlerinde, özellikle *C. albicans*'ta, seksüel üremenin varlığı da gösterilmiştir (Hull ve Johnson, 1999; Butler vd., 2009).

Maya türleri, çeşitli kriterlere göre tanımlanabilir ve özelliklerine göre karakterize edilebilirler. Türlerin tanımlanmasına yönelik analiz yöntemleri arasında; hücre morfolojisi (hücre bölünme şekli ve spor yapısı), Fizyoloji (şeker fermentasyon testleri), İmmünoloji (immunofloresan teknikler) ve moleküler biyoloji temelli genetik çeşitlilik analizleri yer almaktadır. Bu moleküler teknikler arasında Ribozomal DNA filogenisi, DNA rekombinasyonu, DNA baz kompozisyonu, hibridizasyon, rastgele amplifiye polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ve 26S rDNA'nın D1/D2 domain dizilerinin amplifikasyon fragment uzunluğu polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP) bulunmaktadır. Moleküler dizi analizleri, yeni türlerin kategorizasyonu için maya taksonomistleri tarafından giderek daha fazla kullanılmaktadır (Walker, 2009).

Çizelge 1.2: *Candida* türlerinin güncel taksonomisi (Schoch vd., 2020)

Üst alem	Eukaryota
Alem	Fungi
Alt alem	Dikarya
Bölüm	Ascomycota
Alt bölüm	Saccharomycotina
Sınıf	Saccharomycetes
Takım	Saccharomycetales
Familiya	Saccharomycetales fam incertae sedis
Cins	<i>Candida</i>
Tür	<i>C. albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , vb.

Geleneksel identifikasyon yöntemlerinin temeli, mantarların morfolojik ve fenotipik özelliklerini incelemek üzerine kuruludur. Ancak, yeni moleküler yaklaşımlar geleneksel mantar taksonomisinde derin değişimlere yol açmış, *Candida* türlerinde de önemli isim değişikliklerine neden olmuştur. Örneğin, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida rugosa* ve *Candida kefyr* gibi anamorf (aseksüel üreme ile ilişkili isim) tür isimleri, telemorf (seksüel üreme ile ilişkili isim) tür isimleri olarak yeniden isimlendirilmektedir (Borman ve Johnson; 2021; Kidd vd., 2023).

Çizelge 1.3: *Candida* türlerinin güncel olarak isimlendirilmeleri (Kidd vd., 2023)

Önceki isim (Anamorf isim)	Güncel isim (Telemorf isim)	Önceki isim (Anamorf isim)	Güncel isim (Telemorf isim)
<i>C. bracarensis</i>	<i>Nakaseomyces bracarensis</i>	<i>C. lambica</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>C. catenulata</i>	<i>Diutina catenulata</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>C. colliculosa</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>C. neorugosa</i>	<i>Diutina neorugosa</i>
<i>C. eremophila</i>	<i>Pichia eremophila</i>	<i>C. nivariensis</i>	<i>Nakaseomyces nivariensis</i>
<i>C. fabianii</i>	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>C. norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>C. famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>C. pararugosa</i>	<i>Diutina pararugosa</i>
<i>C. fermentati</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>C. pintolopesii</i>	<i>Kazachstania telluris</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i>	<i>C. pseudorugosa</i>	<i>Diutina pseudorugosa</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>C. inconspicua</i>	<i>Pichia cactophila</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>Diutina rugosa</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Cluyveromyces marxianus</i>	<i>C. sorbosivorans</i>	<i>Starmerella sorbosivorans</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>C. utilis</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>

Mayalar içerisinde 200'den fazla *Candida* türü bulunmakla birlikte, yalnızca *C. albicans*'ın hayvanlarda yaygın olarak infeksiyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Markey vd., 2013). *C. albicans*'ın; kuş (Talazadeh vd., 2022), at (Ledbetter vd., 2011), domuz (Zlotowski vd., 2006), köpek (Bradford vd., 2013) ve kedilerde (Seyedmousavi vd., 2018) birçok mikotik kaynaklı infeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir. Sığırlarda; *C. albicans*'ın dışında *C. tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve *C. rugosa* dahil olmak üzere diğer *Candida* türlerinin mastitise neden olduğunu bildiren raporlar mevcuttur (Markey vd., 2013; Zhou vd., 2013; Ksouri vd., 2015; Du vd., 2018).

C. albicans, *Candida* türü infeksiyonlarının en yaygın nedeni olmasına rağmen, son araştırmalarda non-*albicans Candida* türlerinin (NAC) neden olduğu vakalarda artış rapor edilmiştir (Rodríguez vd., 2010). İnsanlardan en sık izole edilen NAC türleri *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. krusei* olarak bildirilmiştir (Parmeland vd., 2013). Süt ineklerinden de mikotik mastitis etkeni olarak izole edilen NAC türleri arasında en yaygın olanlar *C. krusei* ve *C. parapsilosis* olarak bildirilmekle birlikte, *C. kefyr*, *Candida lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *Candida sphaerica*, *C. tropicalis* ve *Candida utilis* gibi NAC türleri de rapor edilmektedir (Türkyılmaz ve Kaynarca, 2011; Du vd., 2018; Yüksel Dolgun vd., 2022).

1.3.1. *Candida* Türlerinin Mikroskopik ve Makroskopik Morfolojisi

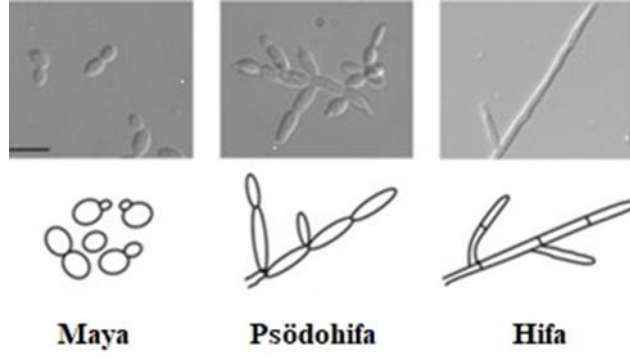
Candida türleri genellikle 2-10 x 3-16 µm boyutlarında, oval, yuvarlak ve silindirik şekilli tomurcuklanan hücrelerden oluşurken filamentler uçtan uca bağlı uzunlamasına hücrelerden oluşan morfolojiye sahiptir. Gram pozitif boyanma özelliği gösteren *Candida* türleri, ince duvarlı, kapsülsüz, hareketsiz, hem aksiyal hem de bipolar tomurcuklanma ile aseksüel olarak üreyen (seksüel üreme gösteren türler hariç), tek hücreli ökaryotik mayalardır (Arda, 2015; Kadosh ve Mundodi, 2020).

Candida türlerinde tomurcuklanma sırasında ana hücrenin bir bölümünün uzamasıyla oluşan yapılar blastospor (blastokonidya) olarak isimlendirilir. *C. albicans* gibi bazı maya türlerinde tomurcuklanma sırasında vejetatif hücrede oluşan

blastosporlar, olgunlaştıktan sonra ana hücreden ayrılmayıp hücre yüzeyinde kalarak psödohifa adı verilen uzun zincirler oluştururlar (Whiteway ve Bachewich, 2007). Psödohifalar, genişliklerinin merkezde uçlardan daha fazla olması ve septal kavşaklarda daralmaları nedeniyle genellikle elipsoidaldır (Sudbery vd., 2004). Maya hücresinin bir dalından oluşabilen gerçek hifalar ise psödohifaların aksine, genellikle birbirine paralel kenarlara sahip, genişlikleri üniform ve daralmaları olmayan gerçek septumlara sahip, düzgün kenarlı yapılardır. Hifa hücrelerinde ayrıca hücresel iletişimi sağlayan gözenekler bulunur (Samanta, 2015; Desai, 2018). Optimal olmayan beslenme koşullarında, 26 °C’de 48-72 saat inkübasyon sonrasında yedek besinleri depolayabilmek amacıyla gelişen bir diğer morfolojik yapı ise klamidospordur. Klamidosporlar maya boyutunun üç ile dört katı kadar büyüklükte olabilen, yuvarlak, kalın duvarlı ve tipik olarak hifal filamentlerin içlerinde, uçlarında veya kenarlarında oluşabilen yapılardır. Klamidospor oluşumunun, özellikle *C. albicans* ve *Candida dubliniensis* gibi türlerde besin açısından zayıf koşullar karşısında geliştirilen bir savunma mekanizması olduğu bilinmektedir (Staib ve Morschhäuser, 2007).

Çizelge 1.4: Patojen *Candida* spp.’lerin morfolojik yapıları (Thompson vd., 2011)

Tür	Morfolojik yapı
<i>C. glabrata</i>	Maya, Yalancı hifa
<i>C. lusitaniae</i>	Maya, Yalancı hifa
<i>C. guilliermondii</i>	Maya, Yalancı hifa
<i>C. parapsilosis</i>	Maya, Yalancı hifa
<i>C. tropicalis</i>	Maya, Yalancı hifa, Hifa
<i>C. dubliniensis</i>	Maya, Yalancı hifa, Hifa
<i>C. albicans</i>	Maya, Yalancı hifa, Hifa



Şekil 1.3: *C. albicans*'ın maya ve filamentöz morfolojileri (Thompson vd., 2011)

Candida türleri, bakteri üremesini inhibe etmek amacıyla penisilin, streptomisin veya kloramfenikol ilaveli Sabouraud Dekstroz Agar (Sabouraud Dextrose Agar, SDA), patates dekstroz agar, kanlı agar ve beyin-kalp infüzyon agar gibi farklı besiyerlerinde üretilirler. *Candida* türlerinin koloni morfolojileri küçük, yuvarlak, yüzeyi düzgün, pürüzsüz (Smooth), parlak ve homojen yapılıdır (Arda, 2015). Koloni morfolojisinin, hücre tipleri ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. Düzgün koloniler blastosporları içerirken, pürüzlü kolonilerde hifa, psödohifa ve blastosporların farklı oranlarda bulunduğu bilinmektedir (Novak vd., 2003). *Candida* türlerinin çoğu zorunlu aerofilik özellik gösterirken, aynı zamanda anaerobik ortamlara da uyum sağlarlar (Dumitru vd., 2004; Arda, 2015). Geniş bir sıcaklık ve pH aralığında üreme yeteneklerine sahiptirler. Besiyerleri genellikle 25-30 °C'de 2-3 gün süreyle inkübe edilirlerken, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilirler (Samanta, 2015; Sachivkina vd., 2021). *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi farklı türlerin tür düzeyinde identifiye edilmesi için özel renkler ürettikleri kromojenik besiyerleri de kullanılabilir (Hospenthal vd., 2006; Charles vd., 2015).

1.3.2. *Candida* Türlerinin Hücre Yapısı

1.3.2.1. Hücre İskeleti

Mayaların hücre iskeleti, sürekli değişen dinamik bir yapıya sahiptir. Bu dinamik yapı protein alt birimleri ile mekanik olarak çalışarak performans gösterir. Hücre iskeleti

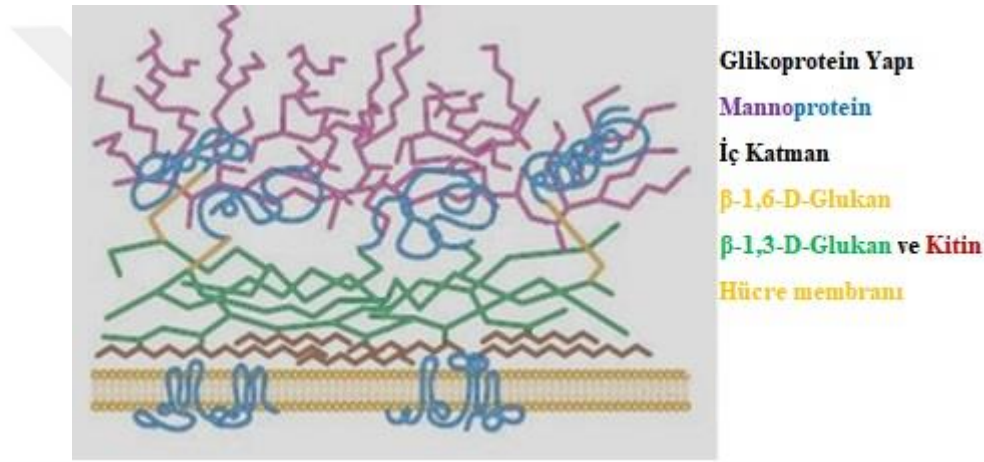
glukanlardan, kitin ve glikoproteinlerden oluşur. Mikrotübüller ve mikrofilamentler hücre iskeletinin fizyolojisinde mitoz bölünmede, mayoz bölünmede, organel hareketliliği ve septum oluşumunda görev alırlar. Alfa tubulin (α -tubulin) ve beta tubulinlerden (β -tubulin) oluşan mikrotübüller membran hareketliliğinde görev alırken, aktin filamentler ve mikrotübüller birlikte sitoplazmik akışkanlıkta ve organel taşımada görev yaparlar. Maya hücre iskeletinde; organel taşınmasında görev alan miyozin ile mitoz bölünmede görevli oldukları bildirilen kinesin ve dinein olmak üzere üç motor protein bulunur (Feldmann, 2011; Garcia-Rubio vd., 2020).

1.3.2.2. Hücre Duvarı

Maya hücre duvarı, hücreye ortamın ozmotik koşullarındaki dalgalanmalara dayanacak mekanik destek sağlayarak hücrelerin hayatta kalması için gerekli, maya hücrelerinin en dış tabakasında yer alan dinamik bir organeldir. Aynı zamanda hücre duvarı hücre büyümesini, hücre bölünmesini ve morfogenezi sağlamak için yeterli esnekliğe sahip bir yapıdır. Böylece hücre duvarı, hücrenin temel mimarisini korur ve duvarın sertliği ile elastikiyeti arasında hassas bir denge kurarak işlevini yerine getirir (Prasad, 2017).

Maya hücre duvarının temel yapısı, mannanlar (mannan polimerleri), β -glukanlar (β -glikozidik bağlarla bağlanan D-glikoz polimerleri) ve kitinler (N-asetil-D-glukozamin polimerleri) dahil olmak üzere çok sayıda karbonhidrat katmanı ile birlikte küçük miktarlarda lipid ve proteinden oluşur (Saijo ve Iwakura, 2011; Arda, 2015). Hücre duvarının ana yapısal polisakkariti olan β -1,3-D-glukan, orta derecede dallanmış bir yapıya sahiptir. Bu yapı, hücre duvarının etrafında uzanan üç boyutlu bir ağı oluşturan stabil bir ilişkiye yol açar (Klis vd., 2001). Hücre duvarının önemli bir küçük bileşeni, liflerin çözünmezliğine katkıda bulunan kitindir. Kitin molekülleri, β -1,4-bağları yoluyla β -1,3-D-glukana bağlanır. β -1,3 glukan-kitin kompleksi iç duvarın ana bileşenidir. Kitinin β -1,3-D-glukan'a çapraz bağlanması duvara sertlik ve dayanıklılık sağlar. β -1,6-D-glukan iç ve dış duvarların bileşenlerini birbirine bağlar (Lipke ve Ovalle, 1998; Arda, 2015). β -1,6-D-glukan bağı suda çözünür, çok dallıdır ve düzenli yapıdan yoksundur. Bağlayıcı β -1,6-D-glukan iskelet iç katmanı ve protein tabaka arasında esnek bağlayıcılar olarak hareket eder. Hücre duvarının yüzeyinde yer alan ve

duvarın kuru ağırlığının yaklaşık %35-40'ını oluşturan bir diğer bileşen protein tabakasıdır. Bu tabaka, hücrenin özelliklerini belirler ve yoğun bir şekilde mannoproteinlerden oluşur. Hücre duvarı proteinlerinden (Cell wall protein, CWP) PIR-CWP, doğrudan β -1,3-D-glukan ile bağlantı kurar. Bu protein, iç hücre duvarını güçlendirme yeteneğine sahiptir. Genellikle hücre duvarının onarımında rol oynayabilir. Bazı CWP'ler, sağlam bir duvarın korunmasına katkıda bulunan dinamik bağlama yeteneklerine sahiptir. Bu nedenle, CWP'lerin hücre duvarı onarım aktivitelerinde ve hücre duvarı yapısının sürdürülmesinde önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Orlean, 2012; Arda, 2015; Prasad, 2017).



Şekil 1.4: *C. albicans*'ın hücre duvarı bileşenleri ve yapısal organizasyonu (Prasad, 2017)

1.3.2.3. Hücre Membranı

Maya hücrelerinin en dış tabakası, hücre duvarı ile çevrelenmiştir. Hücre duvarı, hücrenin yapısını ve dayanıklılığını korurken, aynı zamanda 600 Dalton'dan küçük çözünmüş moleküllerin geçebildiği geçirgen bir yapıya sahiptir. Hücre membranı ise, hidrofilik moleküller için kısmen geçirgen olmayan bir bariyer oluşturur. Bu özelliğinden dolayı hücre membranı, hücre ile dış ortam arasında hayati öneme sahip bir yapıyı oluşturmaktadır (Lipke ve Ovalle, 1998).

Hücre membranı, hem lipitlerden hem de proteinlerden oluşur. Hücre membranının çift katlı fosfolipit tabakası; transport protein, reseptör protein ve sinyal protein adı verilen özel proteinler içerir. Bu proteinler dış çevrenin algılanması, çeşitli

işaretlerin verilmesi, çözünmüş maddelerin alınması, membranın büyümesi, hücre duvarının tamiri ve sentezi, endositoz ve ekzositoz gibi görevler yaparlar (Van Der Rest vd., 1995; Cabezon vd., 2009). Hücre membranının lipid bileşenleri esas olarak; fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilserin ve fosfatidilgliserol gibi fosfolipidlerden ve ayrıca ergosterol ve zosterol gibi sterollerden oluşur (Feldmann, 2011). Hücre membranında yapılarına ve membranla birleşme şekillerine göre, integral ve periferik olmak üzere iki tür membran proteini bulunmaktadır. İntegral membran proteini aynı zamanda transmembran protein olarak da bilinir. Periferik proteinler ise membranın dışına çıkmaz ve onunla etkileşim halinde bulunurlar (Tan vd., 2008).

Maya hücre membranının temel görevleri şunlardır:

- Hücrenin fiziksel olarak korunması
- Osmotik stabilitenin kontrolünün sağlanması
- Hücre duvarı biyosentezinin kontrolü
- Hücre iskeleti bileşikleri için bağlanma noktası olması
- Hücreye giren veya çıkan bileşikleri kontrol eden seçici geçirgenlik bariyeri sağlaması
- Endositoz ve ekzositoz ile ilgili işlevler
- Sinyal iletim yollarının bileşenlerinin konumunun oluşturulması
- Hücre-hücre tanıma ve hücre-hücre yapışma bölgelerinin oluşturulması (Van Der Rest vd., 1995).

1.3.2.4. Hücre Sitoplazması

Diğer tüm hücreli organizmalarda olduğu gibi, maya hücresinin sitoplazması da birçok hücreli aktivitenin merkezi yeridir. Maya hücrelerinin sitoplazması, pH değeri genellikle 5,2 olan, hafif asidik karakterde, koloidal bir sıvı şeklindedir. Sitoplazma; nükleus, nükleolus ve lineer kromozom, lizozom, mitokondri, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, 80S ribozomlar, enzimler, yağ asitleri ile yağ, protein ve karbonhidrat vezikülleri gibi yapı ve organelleri içerir (Feldmann, 2011; Samanta, 2015).

1.3.3. *Candida* Türlerinin Virülens Faktörleri

C. albicans, maya kaynaklı infeksiyon nedenleri arasında virülensi ve patojenitesi en yüksek tür olarak kabul edilmekle birlikte, NAC türlerinden kaynaklanan infeksiyonlar da artmaktadır (Yang, 2003; Cordeiro vd., 2013; Taei vd., 2019). *C. albicans* ve NAC türleri; deri, ağız, gastrointestinal sistem ve vajina gibi farklı anatomik bölgelerde kolonize olan fırsatçı patojenlerdir. *Candida* türlerine bağlı olarak, deri veya mukozal yüzeylerde infeksiyonların gelişmesi ve ilerlemesi genellikle konakta değişiklikler gerektirir. *Candida* türlerinin patojen olma sebebi, duyarlı konakçılarda infeksiyonlara yol açan virülens faktörlerinin varlığına dayandırılmıştır. Bu virülens özellikleri, genler tarafından kodlanan adhezyon yeteneği, morfogenez ve hifa oluşumu, fenotipik değişimler, proteinaz, fosfolipaz, lipaz ve esterazlar gibi enzimler ve biyofilm üretimi gibi faktörleri içerir (Haynes, 2001; Mayer vd., 2013; Mroczyńska ve Brillowska-Dąbrowska, 2021; Macias-Paz vd., 2022).

Candida türlerinde farklı koşullara adapte olmayı sağlayan çeşitli genlerin virülense ve patojeniteye katkı sağladığı bildirilmiştir. Örneğin, *C. albicans*'ın kan dolaşımında veya dokulardaki nötr pH koşullarına uyum sağlamak amacıyla çevresel adaptasyon genlerinden pH düzenleme genini (pH regulated gene, *PHR1*) eksprese ederken, vajinal kanalda asidik pH'da hayatta kalmak için *PHR2*'yi eksprese ettiği belirtilmiştir (Saporito-Irwin vd., 1995; Mühlischlegel ve Fonzi 1997; Abacı ve Haliki, 2004). Benzer şekilde, *C. dubliniensis*'in de çevresel adaptasyon genlerinden *PHR1* ve *PHR2*'yi benzer işlevler için kullandığı rapor edilmiştir (Heinz vd., 2000). *Candida maltosa*'nın çevresel adaptasyon için *PHR1* gen sekansına benzer sekanslara sahip temel psödohifal gelişim geni 1 (essential pseudohyphal development gene, *EPD1*) ve *EPD2* gen sekanslarına sahip olduğu, bu virülens genlerinin *C. maltosa*'nın hücre duvarının yapısına katıldığı, pH koşullarına uyum sağlamada görev aldığı ve psödohifal büyüme için önemli olduğu belirtilmiştir (Nakazawa vd., 2000).

1.3.3.1. Adhezyon

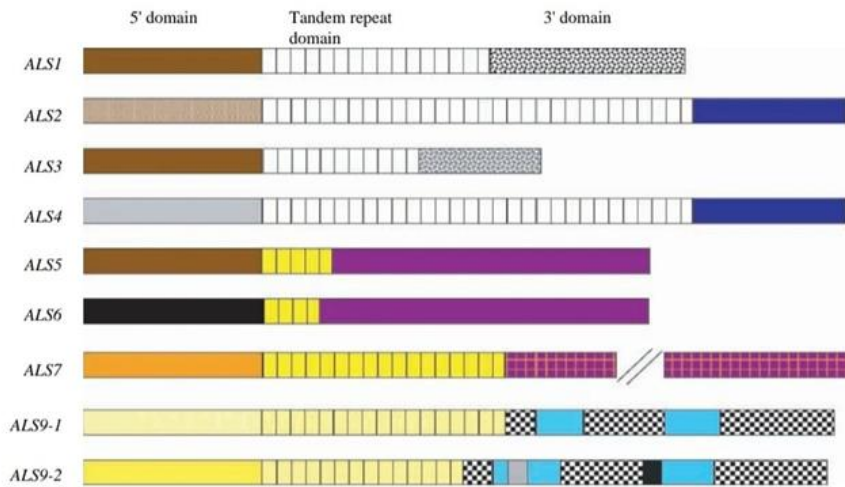
Adhezyon yeteneğinin özellikle *C. albicans*'ın konak hücrelere (biyotik ortam) tutunmasında ilk adım görevi gördüğü, ayrıca *C. albicans* ve NAC türlerin tıbbi cihazlara yapışmasına (abiyotik ortam) ve biyofilm oluşturmaya da yardımcı olduğu bilinmektedir (Sun vd., 2015). Bu durumun, tıbbi uygulamalarla ilişkili olarak kandidemi gelişimini ve antifungal ilaçlara karşı direnç oluşumunu artırabileceği bildirilmiştir (Silva-Dias vd., 2015; Cavaleiro ve Teixeira, 2018). *C. albicans* ve patojen NAC türleri arasında adhezyon yeteneği yüksek suşların, daha az yapışma özelliği gösteren suşlardan daha patojen olduğu kabul edilmektedir. (Calderone ve Braun 1991; Deorukhkar vd., 2014; Singh vd., 2021). *C. albicans* için adhezyonla ilişkilendirilen genler aglutinin-benzeri sekans (agglutinin-like sequence, *ALS*), hifal duvar proteini (hyphal wall protein, *HWP1*), integrin (*INT1*), mannoziltransferaz (mannosyltransferase, *MNT1*) ve protein mannoziltransferaz (protein mannosyltransferases, *PMT1/6*) genleri olarak belirtilirken, NAC türleri için *ALS* ve epitelial adhezyon proteinleri (epithelial adhesin protein, *EPA1*) genleri bildirilmiştir (Calderone ve Fonzi 2001; Yang, 2003; Harris vd., 2009; Noumi vd., 2015; Vale-Silva vd., 2016).

Hedef hücreye adhezyon aşamasında, hücre yüzeyindeki glikoproteinleri kodlayan *ALS* gen ailesi anahtar bir rol oynar. *ALS* geni, hem *C. albicans* hem de diğer *Candida* türlerinde bulunur ve patojenite mekanizmalarıyla ilişkilendirilen gen ailesinin bir örneğini oluşturur (Cota ve Hoyer, 2015; Oh vd., 2019). Tipik bir *ALS* geninin şematik gösterimi Şekil 1.5'te gösterilmiştir (Hoyer, 2001a). *ALS* gen ailesi, üç ortak özelliğe sahip glikoproteinden oluşur. Bu özellikler korunmuş bölge (5' domain), merkezi bölge (108 baz çiftinden oluşan tandem tekrarları içeren domain) ve serin-treonin zengini bölge (3' domain) olarak adlandırılır (Calderone ve Fonzi, 2001). *ALS* gen ailesinin korunmuş olan 5' domain alanının uzunluğu aile boyunca neredeyse sabit kalsa da, tandem tekrar bölgesi ve 3' domain alanlarının uzunlukları oldukça değişkenlik gösterir (Hoyer, 2001a).



Şekil 1.5: Tipik bir *ALS* geninin şematik gösterimi (Hoyer, 2001a)

C. albicans'ın *ALS* gen ailesinin, hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlayan sekiz geni içerdiği belirtilmektedir (Şekil 1.6). Bu *ALS* genleri arasındaki yoğun sekans benzerliği ve genellikle aynı *C. albicans* türünde bulunan çeşitlilik, gen ailesinin karmaşık tanımını ve karakterizasyonunu daha da karmaşık hale getirir. *ALS* proteinlerinin konak yüzeylere adhezyon rolleri dışında, *C. albicans*'ın biyolojisi ve patogenezinde önemli olduğu bildirilmiştir (Hoyer vd., 2008). *ALS1* geni, enfeksiyonun ilk evresinde organizmanın ağız mukozasına tutunması için önemlidir (Kamai vd., 2002). *ALS1* ve *ALS5* genleri, fibronektin glikoproteini ve insan bukkal epitel hücrelerine adhezyon işlevine sahip özellikleriyle öne çıkar (Hoyer, 2001)



Şekil 1.6: *C. albicans*'ın *ALS* gen ailesinin yapısı. *ALS* gen ailesi 5' domain alanının uzunluğu tüm *ALS* genlerinde benzerdir. Tandem tekrar domain alanı *C. albicans* suşuna göre ve aynı suş içinde değişiklik göstermektedir. *ALS9* geni iki allel olarak gösterilmiştir. *ALS7*'nin 3' domain alanları değişken uzunluktadır. Tekrarlanan bölgenin konumu paralel, çapraz çizgilerle işaretlenmiştir. *ALS8*, kodlama bölgesi *ALS3* ile aynı olduğundan ve tek bir lokus tarafından kodlandığından şekilden çıkarılmıştır (Hoyer vd., 2008)



Şekil 1.7: *C. albicans*'ın ALS gen ailesinin içinde bulunan farklı sekansların insan biçiminde sunumu. Görüntünün arka planında yapım aşamasında olan yeni bina, ALS proteinleri için tespit edilen non-adheziv işlevleri temsil etmektedir (Hoyer vd., 2008). *ALS3* geninin silinmesi, *C. albicans*'ın adhezyonunu diğer genlerin silinmesine göre daha fazla azalttığı için, bu gen "kraliyet cübbesi" ile temsil edilmektedir. *ALS3*'ün silinmesinin, *C. albicans* adhezyonunu etkileme konusunda *ALS1*'in silinmesinden daha belirgin bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Zhao vd., 2004)

ALS gen kodları, *C. albicans*'ın yanı sıra *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis*'te de Southern blot ve Western blot yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir (Hoyer vd., 2001b). Ayrıca, birbirine yakın ancak farklı üç tür olan *C. parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* türlerinde de *C. albicans*'ta bulunan *ALS* genlerinin kodlama özelliklerinde benzerlikler ve farklılıklar gözlemlenmiştir (Oh vd., 2019).

HWP1 geni; biyofilm gelişimi sırasında da rol alan bir diğer adhezyon genidir. *ALS* proteinleri gibi bir mannoprotein olan *HWP1*, iyi karakterize edilmiş hifal adhezini olup, *C. albicans*'ın konak hücrelere kovalent bağlanmasına aracılık eder (Inci vd., 2013). Adhezyonda görev alan diğer genlerden biri olan *INT1* geninin kodladığı proteinlerin salgılanmasında meydana gelen aksaklıklar ya da *INT1* geninde meydana gelen mutasyonların, *C. albicans*'ın insan epitel hücrelerine adhezyonunu %40 oranında azalttığı bildirilmiştir (Gale vd., 1998). *Candida*'ların hücre duvarının ana bileşeni mannanıdır. Mannan *Candida*'ların konak hücreye adhezyonunda önemli rol oynar.

MNT1 ve *MNT2* α -1,2-mannozil transferazı kodlayan ve mannoproteinlerin sentezinde görev alan genlerdir. *MNT1-2*'in olmamasının, *C. albicans*'ın insan bukkal epitel hücrelerine, sıçan vajinal epitel hücreleri ve diğer hücrelere adhezyon kabiliyetini azalttığı bildirilmiştir. Bu nedenle *MNT1-2* genleri *C. albicans*'ın adhezyonunda ve virülensinde kritik öneme sahiptir (Buurman vd., 1998; Munro vd., 2005; Mora-Montes vd., 2010).

1.3.3.2. Morfogenezis (Morfolojik değişim, Dimorfizm)

Morfogenezis (morfolojik değişim) terimi, tek hücreli maya formundan filamentli hifa ve psöдохifa formları arasında geri dönüşümlü olarak gerçekleşen geçişi tanımlar. *Candida* türleri arasında sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in bu form değişikliğini gerçekleştirebildiği belirtilmekte, bu nedenle bu türler polimorfik maya türleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Calderone ve Fonzi, 2001). Özellikle *C. albicans*'ın maya formundan hifa formuna geçişinin patojenite için kritik olduğu ifade edilmiştir (Van Der Meer vd., 2010; Desai vd., 2018). Hifal formun, epitel hücrelerini istila ederek dokusal hasara yol açma mekanizmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Morfogenezin gerçekleşmesi için, besin durumu, serum varlığı, N-asetilglukozamin seviyeleri, sıcaklık ve CO₂ gibi çeşitli koşulların etkili olduğu bildirilmektedir (Sudbery, 2011). Ayrıca pH, morfogenezin başlatılmasında oldukça önemlidir. Besin eksikliğinde *C. albicans*'ın karbon kaynağı olarak aminoasitleri kullanabildiği, amino nitrojeni amonyak olarak salgılayarak çevresel pH'yı yükselttiği ve morfogenezi uyardığı, böylece doğrudan patogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Böylelikle, *C. albicans*'ın ortamının pH'sını aktif olarak değiştirebildiği ve hifal forma geçişini başlatabildiği ve patojenitedeki kritik önemi gösterilmiştir (Vylkova vd., 2011).

Daha invazif olduğu bildirilen hifal formun düzenlenmesinde görev alan bazı genler arasında; hücre duvarı proteinlerini kodlayan *PHR1*, hücre uzama derecesini kodlayan (Extent of cell elongation, *ECE1*) ve pH'yı düzenleyici antijeni kodlayan (pH-regulated antigen, *PRA1*) bulunur. Ayrıca biyofilm oluşumunun düzenleyen (Regulator of biofilm formation, *RBF1*), filamentöz büyümeyi geliştiren (enhanced filamentous growth, *EFG1*) ve kitin sentaz izoenzimini kodlayan (Chitin Synthesis, *CHS2*) genler

bulunmaktadır (Mitchell, 1998; Sharkey vd., 1999; Martin vd., 2013). Bu genlerin yanı sıra, hifa oluşumunu doğrudan etkilemeyen ancak virülens faktörlerini kodlayan protein tabanlı genler de bildirilmiştir. Bu genler arasında *HWP1*, *ALS3* ve salgısal aspartil proteinaz 4/5/6 (secreted aspartyl proteinases, *SAPs*) bulunmaktadır (Mayer vd., 2013).

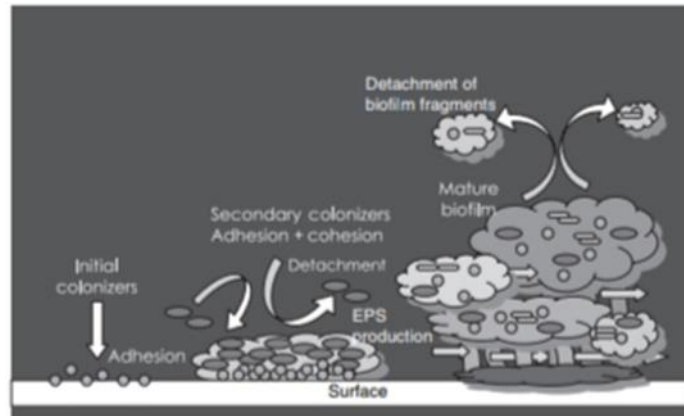
1.3.3.3. Fenotipik Değişim

Uzun yıllardır, fenotipik değişim özelliği özellikle *C. albicans* üzerinde yoğun bir şekilde araştırılmış ve fenotipik değişimin *C. albicans*'ın antijenik özelliğini ve biyofilm oluşumunu etkilediği öne sürülmüştür (Mayer vd., 2013; Macias-Paz vd., 2022). Temelde iki farklı fenotipik değişim şekli olduğuna inanılmaktadır. İlk fenotipik değişiklik hücrenin şeklinde ortaya çıkar. *C. albicans* kolonileri düz, pürüzlü, yıldızlı, noktalı, şapkalı ve düzensiz yapılar gibi çeşitli fenotipler arasında geçiş yapabilir. Bu fenotipik değişim geri dönüşümlü olarak meydana gelir (Slutsky vd., 1987; Soll, 2014). İkinci fenotipik değişim, özellikle *C. albicans* için en ilgi çekici olanıdır. "White-Opaque (Beyaz-Opak, W-O) hücre dönüşümü" olarak adlandırılan bu fenomen, beyaz renkli oval hücrelerden gri renkli uzun hücrelere geçiş yeteneğini ifade eder. *C. albicans*'lar normal maya morfolojisinde beyaz renkli hücre yapısına sahipken, seksüel hücre morfolojisi aşamasında opak renkli hücre yapısındadırlar (Sasse vd., 2013). Beyaz hücreler yarı küre şeklinde beyaz renkli koloniler oluştururken, opak hücreler düz, gri koloniler oluşturur (Morschhäuser, 2010). Bu özellik, belirli gen faktörlerinin katkısıyla gerçekleşmektedir. Beyaz renkli hücrelerin *SAP2*, beyaz spesifik (White-specific, *WH11*) ve *EFG1* gibi protein temelli genleri salgıladığı, opak hücrelerin ise *SAP1* ve *SAP3* genlerini salgıladığı belirtilmiştir. Opak hücrelerin deride kolonizasyon yeteneklerinin daha fazla olduğu gösterilmesine rağmen, şaşırtıcı şekilde hayvan modeli deneyinde beyaz hücrelere göre letal gücünün daha düşük olduğu bildirilmiştir (Kvaal vd., 1999, Miller ve Johnson, 2002). Fenotipik değişim çoğunlukla *C. albicans*'ta meydana gelmekte olsa da, *C. glabrata* ve *C. lusitanae*'nin de benzer fenotipik değişimler gösterdiği bildirilmiştir (Jain vd., 2008).

1.3.3.4. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu *Candida* spp.'lerin patojenitesinde önemli bir virülens faktörü olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşumunun antifungal ajanlara karşı direnç gelişimini arttırdığı, lenfositlerin ve lökositlerin etkinliğinde azalmaya neden olduğu, fagositoz gibi immunolojik savunma mekanizmalardan korunmayı sağladığı ve böylece de virülensi artırdığı bilinmektedir. Bu sebeple, araştırmacılar biyofilm gelişiminin önlenmesine ve antifungal direncin yönetimine odaklanmışlardır (Hirota vd., 2017; Silva vd., 2017; Rodríguez-Cerdeira vd., 2020). Biyofilm tabakası oluşumunu etkileyebilecek çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Bunlar; substratum tabakası, hücre dışı polimerik maddeler (extracellular polymeric substances, EPS), besin ve oksijen varlığıdır (Seneviratne vd., 2008). *Candida* spp.'lerde yaygın bir fenomen olarak görülen biyofilm oluşumunun endotrakeal tüpler, stentler, implantlar, kalp pilleri ve kataterler gibi tıbbi cihazların neredeyse tamamında gözlemlendiği rapor edilmiştir (Ramage vd., 2006; Høiby vd., 2015; Nobile ve Johnson, 2015; Malinovská vd., 2023).

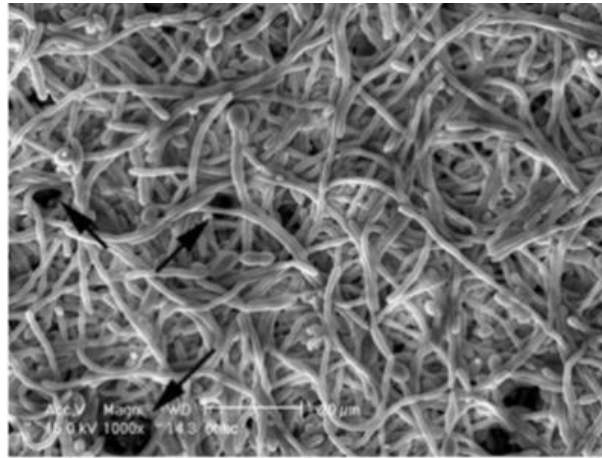
Biyofilm oluşumu kısaca dört aşamada meydana gelir: İlk aşamada mikroorganizmanın yüzeye adhezyonu gerçekleşir. İkinci aşamada yeni hücre kolonilerinin oluşumu ve düzenlenmesi, üçüncü aşamada hücre dışı polimerik maddenin salınması ve üç boyutlu bir yapıya dönüşüm tamamlanır. Son olarak, yeni biyofilm hücrelerinin yayılmasıyla aşamalar tamamlanır (Seneviratne vd., 2008).



Şekil 1.8: Biyofilm oluşumunun sırasıyla gösterimi (Seneviratne vd., 2008)

Adhezyon başlangıcında hücreler ve hücreler arasındaki spesifik olmayan etkileşimler, hidrofobik ve elektrostatik kuvvetler gibi unsurlar aracılık eder. Adhezyon süreci genellikle bir iki saat içinde tamamlanır (Donlan ve Costerton, 2002). Daha sonra, daha güçlü yapışmayı sağlamak için spesifik adhezyon molekülleri salgılanır. Bu spesifik adhezyon molekülleri arasında en bilineni *ALS* genleri tarafından kodlanan hücre yüzeyi glikoproteinleri olarak bilinenlerdir (Zhao vd., 2005). Biyofilm oluşumu ve organizasyon aşaması, erken faz (0-11 saat), orta faz (12-30 saat) ve olgunlaşma fazı (38-72 saat) olmak üzere üç fazda meydana gelir. Erken aşamada, blastosporların yapışması ve belirgin mikrokolonilerin gelişimi ile karakterizedir. Orta faz aşaması dimorfizmin gerçekleştiği, germ tüpleri ve genç hifaların karışımından oluşan iki katmanlı biyofilm tabakasının gözlemlenebildiği aşamadır. Olgunlaşma sırasında, biyofilm kalın bir EPS tabakasına dönüşür ve bu tabaka içinde yoğun bir ağ içinde maya, psödohifalar ve hifalar gömülüdür (Seneviratne vd., 2008). *In vivo* modellerde oluşturulan *Candida* biyofilmleri bahsedilen sırayı takip ediyor gibi görünmektedir. Bununla birlikte, *in vivo* modellerde gelişen biyofilm tabakasının olgunlaşma hızı ve kalınlığı, *in vitro* sistemlerde gelişenlerden daha hızlı ve daha kalındır (Andes vd., 2004; Martinez ve Fries, 2010).

Biyofilm oluşumu ve gelişiminin incelenmesinde, elektron mikroskobu, floresan mikroskobu ve konfokal mikroskop kullanımı gibi mikroskopik yöntemler kullanılmaktadır (Andes vd., 2004; Costa-Orlandi vd., 2017).



Fotoğraf 1.1: *C. albicans*'ın Elektron Mikroskobu ile biyofilm analizi (Seneviratne vd., 2008)

Biyofilm oluşturma yeteneği genellikle insan orijinli *Candida* izolatlarında araştırılmıştır. Bu yetenek, özellikle *C. albicans* suşları ile ilişkilendirilmekle birlikte, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. kefyr* gibi NAC türlerinde de biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (Hasan vd., 2009; Satılmış vd., 2011; Costa vd., 2018; Malinovsk  vd., 2023). Türkiye’de mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada, biyofilm oluşumunun *C. krusei* (n=7), *C. kefyr* (n=4), *C. guilliermondii* (n=1), *Candida famata* (n=1) ve *Candida laurentii* (n=1) olmak üzere toplam 14 non-*albicans* izolatta tespit edildiği rapor edilmiştir (Türkyilmaz ve Kaynarca, 2011). Benzer şekilde, Afyonkarahisar’da Anadolu mandalarında mastitis nedeni olarak izole edilen 66 *Candida* izolatının 53 tanesinde biyofilm oluşturma özelliği pozitif bulunmuştur. Aynı çalışmada, biyofilm oluşturan *Candida* türleri *C. krusei* (n=18), *C. rugosa* (n=8), *C. kefyr* (n=5), *C. tropicalis* (n=7), *C. albicans* (n=3), *C. zeylanoides* (n=3), *C. parapsilosis* (n=4), *C. guilliermondii* (n=3), *C. famata* (n=1) ve *C. glabrata* (n=1) olarak sıralanmıştır (şeker ve  zen , 2011).

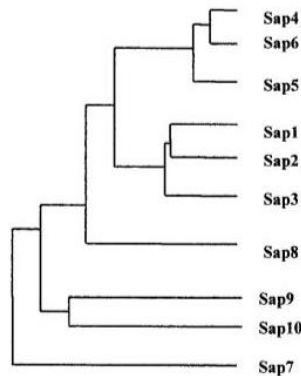
1.3.3.5. Enzimler

Mikroorganizmaların vir lensine katkıda bulunan önemli faktörlerden biri hidrolitik enzim üretimidir. Bu enzimlerin, bakterilerin, protozoaların ve patojenik mayaların patojenitesinde merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu enzimler arasında özellikle proteinazların vir lensle ilişkili en yaygın enzimler olduğu ifade edilmektedir (Naglik vd., 2003). *C. albicans*’da bulunan protein bazlı enzimlerin bir kısmının spesifik olarak salgılanan enzimler olduğu, bir kısmının ise hücre duvarından veya spontan hücre lizisinin sonucu olarak sitoplazmadan salınan bileşenler olduğu belirtilmektedir (Mart nez vd., 1998; Chaffin, 2008; Satala vd., 2020). *C. albicans* tarafından üretilen bu hidrolitik enzimler arasında salgısal aspartil proteinaz, fosfolipazlar, asit fosfataz, kitinazlar, esteraz ve glukoamilaz gibi enzimler yer almaktadır (Chaffin vd., 1998; Naglik vd., 2003; Schaller vd., 2005; Bramono vd., 2006; Chaffin, 2008). Bu enzimler arasından özellikle salgısal aspartil proteinaz, fosfolipaz B ve lipazlar olmak üzere üç önemli hücre dışı hidrolitik enzimin  ne çıktığı ifade edilmektedir (Naglik vd., 2003). İnfeksiyon sırasında bu hidrolitik enzimlerin salgılanmasının, etkenlerin konak

hücrelerine adhezyonuna, invazyona ve konakçı bağışıklık faktörlerinin yok edilmesine yardımcı olarak virülense katkı sağladığı düşünülmektedir (Hube ve Naglik, 2001).

1.3.3.5.1. Salgısal Aspartil Proteinazlar

C. albicans, infeksiyon oluştururken konak organizmada kolonize olmak, infeksiyona yol açmak ve konak savunma mekanizmalarından kaçmak amacıyla oldukça geniş bir virülens faktör yelpazesine sahiptir. *C. albicans*'ın virülensinde kritik bir rol oynadığı kabul edilen salgısal aspartil proteinaz (SAP) gen ailesi, on adet farklı SAP proteini kodlar. Bu SAP gen ailesi üyeleri çeşitli alt gruplara ayrılmıştır (Hube ve Naglik, 2001). SAP genlerinin sekizi (SAP1-8) tarafından kodlanan proteinler hücre dışı boşluğa salgılanırken, SAP9 ve SAP10 genleri tarafından kodlanan proteinlerin membran bağlantılı Glikosil-Fosfatidil-İnositol (GPI) proteini olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bu SAP proteinlerinin *Streptomyces* spp.'lerden salınan pepstatin A tarafından inhibe edilebildiği ve çoğunun asidik pH aralığında en uygun aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Schaller vd., 2005; Dos Santos, 2010). SAP gen ailesi, aminoasit dizisi sekansına dayalı olarak üç ana alt aileye ayrılır. SAP1-2-3'ten oluşan ilk grupta aminoasit dizilişi %67 oranında aynıdır. İkinci grup SAP4-5-6'dan oluşur ve aminoasit dizilişi yönünden %89 homologluk gösterir. Her ikisi de GPI protein dizilerine sahip olan SAP9 ve SAP10 ise üçüncü grubu oluşturur. SAP7 ve SAP8'in farklı olduğu ve alt aile üyeleri olarak kabul edilmediği bildirilmiştir (Naglik vd., 2008).



Şekil 1.9: *C. albicans*'a ait SAP virülens gen ailesinin dizi homolojisiyle gruplarının gösterilmesi (Naglik vd., 2003)

En son yapılan araştırmalar, *SAP1-6* arasında önceki çalışmalarla uyumlu bir şekilde en yüksek proteolitik aktivitenin pH 3,0-5,0 aralığında gözleendiğini gösterirken, *SAP7* ve *SAP8*'in farklı özellikler sergilediğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda, *SAP7*'nin aspartil proteaz aktivitesi için sıra dışı bir pH olan nötr pH'da optimal aktivite sergilediği ve pepstatin A'nın bu proteolitik aktiviteyi inhibe etme kapasitesinin son derece düşük olduğu görölmüştür. Bunun yanı sıra, *SAP8*'in tüm *SAP* izoenzimleri içinde en düşük pH olan 2,5'te en yüksek proteolitik aktiviteyi göstermiş olduğu bildirilmiştir (Aoki vd., 2011).

C. albicans hücre dışı proteinaz üreten tek *Candida* türü değildir. *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi patojenik *Candida* türlerinin de, *in vitro* koşullarda aktif hücre dışı proteinazlar üreten *SAP* genlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Moran vd., 2012; Silva vd., 2012). *C. tropicalis*'in dört *SAP* genine, *C. parapsilosis*'in en az iki *SAP* genine sahip olduğu bilinmektedir. *SAP* proteinlerinin *C. dubliniensis* virölensinde ne kadar önemli olduğuna dair yayınlanmış çok az bilgi olsa da, bu türün de en az dokuz *SAP* genine sahip olduğu düşünölmektedir (Naglik vd., 2003). Hematojen *Candida* infeksiyonları ve virölens faktörleri üzerine yapılan bir çalışmada, izole edilen 68 *C. albicans* izolatının 61'inde (%89,7), non-*albicans* türler olarak izole edilen 31 izolatın sadece sekizinde (%25,8) pozitif proteinaz aktivitesi tespit edilmiştir (Gokce vd., 2007).

1.3.3.5.2. Fosfolipazlar

Fosfolipaz enzimi, konak hücreyi lizise uğratma veya hücre yüzeyinin özelliklerini değiştirme yeteneğinden dolayı infeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bu tür değişikliklerin, mantarın dokuya adhezyonuna ve penetrasyonuna yardımcı olduğu düşünölmektedir (İbrahim vd., 1995; Ghannoum, 2000; Theiss vd., 2006). Fosfolipaz (PL), heterojen bir enzim grubunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu enzim grubu, gliserofosfolipidlerde bulunan ester bağlantısını parçalama yeteneğine sahiptir. *C. albicans*'ta fosfolipaz A (PLA), fosfolipaz B (PLB), fosfolipaz C (PLC) ve fosfolipaz D (PLD) olmak üzere dört farklı tip fosfolipaz tanımlanmıştır. Ancak hücre dışında sadece *PLB1* ve *PLB2* genlerinin ürünleri olan fosfolipazlar tespit edilmiştir.

PLB1'in, *C. albicans* tarafından salgılanan fosfolipaz B aktivitesinin çoğundan sorumlu olduğu düşünülse de, *PLB2*'nin de bu aktiviteye küçük de olsa katkıda bulunduğu ifade edilmektedir. *PLB1* geni bulunmayan izolatlarda kalıntı miktarlarda fosfolipaz B aktivitesine rastlanması, bunun kanıtı olarak düşünülmektedir (Ghannoum, 2000).

Fosfolipaz enzimi ve *PLB* geni varlığı genellikle uzun süredir *C. albicans* ile ilişkilendirilmiş olsa da, sınırlı sayıda çalışma *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* gibi türlerde de bu enzimin varlığını göstermiştir (Ghannoum, 2000; Anil ve Samaranayake, 2003; Harmal vd., 2013; Rossoni vd., 2013; Fatahinia vd., 2017).

1.3.3.5.3. Lipazlar ve Estrazlar

C. albicans'ın hücre dışı proteinazları ve fosfolipazlarına yoğun ilgi gösterilirken, lipazlar ve esterazlar göz ardı edilmiştir. Esterazlar ve lipazlar mono, di ve triasilgliserollerin, hatta fosfolipidlerin, ester bağlarının hidrolizini katalizleyen yetenekleri ile tanımlanmışlardır. Ancak, çözünür substratlar üzerindeki etkileşimleri farklılık gösterir. Lipazlar, çözünmeyen triasilgliserol fazı ile enzimin içinde çözündüğü sulu faz arasındaki ara yüzde ester bağlarını hidrolize ederler. Bu nedenle, lipazlar genellikle çözünmeyen yağ damlacıklarının yüzeyinde etkili olurlar. Esterazlar ise çözünür substratlar üzerinde etki gösterirler ve ester bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler (Schaller vd., 2005). *C. albicans*'ta lipaz ve esteraz genleri üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, lipaz geni (lipase, *LIP*) ilk olarak Fu vd. (1997) tarafından, esteraz geni (esterase) ise Tsuboi vd. (1996) tarafından keşfedilmiştir. Southern blot analizi sonucunda *C. albicans*'ın lipaz gen ailesi olan *LIP*'ye sahip olabileceği gösterilmiş ve ayrıca bu analizler lipaz genlerinin *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi türlerde de bulunabileceğini ortaya koymuştur. Ancak *C. pseudotropicalis* ve *C. glabrata* gibi diğer türlerde bu lipaz geni tespit edilmemiştir (Fu vd., 1997). Tsuboi vd. (1996) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 85 *Candida* izolatının esteraz aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmada, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi türlerde esteraz enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu, ancak *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. guilliermondii* gibi türlerde ise daha düşük bir enzim aktivitesi gözlemlendiği bildirilmiştir.

1.4. *Candida* İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji ve Patogenez

Son otuz yılda, bağışıklık sistemi baskılanan insanlarda özellikle *Candida*, *Aspergillus* ve *Cryptococcus* spp. gibi mikroorganizmaların neden olduğu mantar kaynaklı infeksiyonlar ortaya çıkmıştır. İnsanlarda invazif kandidiazis nedeni olarak 30'dan fazla farklı *Candida* spp. bildirilmiştir. Ancak bu infeksiyonların %90'ından fazlası *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* olmak üzere temelde beş tür tarafından oluşturulmaktadır (Miceli vd., 2011; MacCallum, 2012; Spampinato ve Leonardi, 2013; Kumar vd., 2022). İnsanlarda deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerin mikrobiyolojik florasının normal üyeleri olarak kabul edilen *Candida* türleri, ayrıca solunum sisteminde de görülebilen fırsatçı patojenlerdir (Nobile ve Johnson, 2015; Limon vd., 2017; Valand ve Giriya, 2021; Lopes ve Lionakis, 2022). *Candida* türleri dünyanın birçok bölgesinde nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonlarının en yaygın nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır (DiazGranados vd., 2008; Doi vd., 2016; Bac vd., 2019). Ayrıca bu etkenler, Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) hastalarında en sık görülen mantar infeksiyonu nedenlerindendir (Fidel vd., 1999; Anwar vd., 2012; Maheshwari vd., 2016; Lamichhane vd., 2020). *Candida* türleri arasında *C. albicans*, insanlarda en yaygın bulunan ve en önemli tür olarak kabul edilmektedir (Eggimann vd., 2003; Turner ve Butler, 2014; Nobile ve Johnson, 2015; Talapko vd., 2021; Anderson vd., 2023; Rapala-Kozik vd., 2023).

İnsanlarda *Candida* türleri ile ilgili infeksiyonların spektrumu geniştir. Bazı durumlarda *Candida* infeksiyonu geçiren hastaları tanımlamak zordur ve yayımlanmış çalışmalarda tanımlar üzerinde bir fikir birliği yoktur. Üzerinde fikir birliği olunan tek konu ise infeksiyonların özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda görülmesidir. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda, invazif karakterdeki kandidiyazis için kandidemi ve sistemik kandidiyazis olmak üzere iki terim kullanılır. Kandidemi, *Candida* spp.'nin kandan izolasyonunu ifade eder. Hasta geçici olarak ilişkili infeksiyon belirtileri gösteriyorsa, kandidemi kanıtlanmış kabul edilir. Sistemik kandidiyazis ise, genellikle kültür veya histoloji sonuçlarıyla ortaya çıkan, normalde steril olan bölgelerde *Candida* spp.'nin varlığının tespit edildiği durumları ifade eder (Eggimann vd., 2003). Kandidemi ve invazif kandidiyazis, *Candida* türlerine bağlı olarak gelişen mikozisler arasında

tartışmasız en sık rastlananlarıdır. Bu infeksiyonlarda genellikle en sık karşılaşılan tür *C. albicans* olmakla birlikte; *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* gibi diğer türler de nadiren de olsa izole edilebilmektedir (Pfaller vd., 2014). Hastane ortamında hala ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan bir sorun olarak devam etmekte olan kandidemilerin epidemiyolojisi değişmektedir. Yapılan bir araştırmada, NAC türlerine bağlı kandidemi insidensi, *C. albicans* kaynaklı kandidemi insidensine göre daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Horn vd., 2009). Kandidemi vakalarına yönelik farklı araştırmalarda, *C. albicans* en sık izole edilen tür olarak bildirilse de, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'in neden olduğu vakaların sayısı arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Kuzey Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmalarda, *C. glabrata*'nın neden olduğu vaka sayısı yüksek olarak bildirilirken, İspanya ve Brezilya'daki çalışmalarda, *C. parapsilosis* nedenli vakaların *C. glabrata*'nın neden olduğu vaka sayısından daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Guinea, 2014). Küresel olarak, *C. albicans* sıklığı azalırken, *C. glabrata* ve *C. krusei*'nin sıklığının sabit kaldığı, buna karşın *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in sıklığında artış gözlemlendiği vurgulanmaktadır (Pfaller vd., 2010; Pfaller vd., 2019). Hasta özelliklerinin ve önceki antifungal tedavinin coğrafi alandan bağımsız olarak *Candida* spp.'nin dağılımı ve sıklığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Guinea, 2014).

Candida türlerine bağlı infeksiyonlar; bağışıklık ve hormonal yetersizlikler, normal floranın kolonizasyon direncinin azalması veya konakçıların hassas dokularının etkenlere yoğun olarak maruz kalması ile ilişkilendirilir. Bu koşullar, bebekler, diyabet hastaları, antibiyotik ve steroid kullanan bireyler, kalıcı katetere sahip hastalar ve laktasyon dönemindeki ineklerin meme bezlerinin duyarlılığını açıklamaktadır (Pohlman ve Chengappa, 2022).

İnsanlardakine benzer şekilde, hayvanlardan da en sık izole edilen türler *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'dir. Sağlıklı hayvanların florasının doğal bir parçası olarak bulunan bu türler, kommensal ve fakültatif patojen olarak kabul edilirler (Blanco ve Garcia, 2008; Nadăș vd., 2014; Seyedmousavi vd., 2018; Mba ve Nweze, 2019; Bastos vd., 2023). *C. albicans* ve *C.*

glabrata çoğunlukla sıcakkanlı konakçılarda görülürken, diğer bulaşıcı *Candida* türleri de çevrede bulunmaktadır. İnfeksiyonlar genellikle konağı önceden kommensal olarak kolonize eden suşlar tarafından tetiklenir. Bu nedenle, zoonotik potansiyelin düşük olduğu düşünülmektedir (Seyedmousavi vd., 2018). İnsanlarda olduğu gibi, hayvanlarda da en patojen tür *C. albicans* olmasına rağmen, infeksiyon bölgesine bağlı olarak belirli hayvanlarda diğer *Candida* türleri de yaygın birer patojen olabilir. Hayvanlarda *Candida* kaynaklı kandidiyazisler, kanatlı hayvanlar (Sokół vd., 2020), domuzlar (Shimada vd., 2021), atlar (Pirrone vd., 2012), sığırlar (Du vd., 2018), kediler (Duchaussoy vd., 2015), köpekler (Willems vd., 2017), primatlar (Samaranayake ve Samaranayake, 2001) ve deniz memelileri (Takahashi vd., 2010) gibi birçok hayvan türünde rapor edilmiştir. Kandidiyazis hayvanlarda primer infeksiyon nedeni olmasına rağmen, *Candida* türlerinin neden olduğu bulgular, bakteriyel infeksiyonlara eşlik eden sekonder infeksiyon tablosu olarak da ortaya çıkabilir. Özellikle konakçıların antibiyotik tedavisine yanıt vermediği durumlarda, *Candida* infeksiyonları olası bir seçenek olarak düşünülmelidir (Seyedmousavi vd., 2018).

C. albicans, yüzeysel ve derin dokuları etkileyen maya infeksiyonların baskın nedeni olan polimorfik bir maya türüdür (Qin vd., 2016). *Candida* türlerinin patogezinde adhezyon yetenekleri dokulara tutunmayı kolaylaştırır. Fosfolipaz ve proteaz enzimleri üretiminin, dokuların invazyonuna yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Maya formunun epitelyal yüzeylere kolonizasyondan sorumlu form olduğu düşünülürken, doku penetrasyonu ve invazyonu hifa formuyla sağlanır. *Candida* infeksiyonlarında hazırlayıcı faktörler arasında hücresel bağışıklık yetersizliği, eşlik eden hastalık, antimikrobiyal ilaçların uzun süreli kullanımı nedeniyle normal floranın bozulması ve kalıcı kateterlerden mukozanın hasar görmesi gibi faktörler yer alır. *Candida* infeksiyonlarında etkilenen mukoza genellikle kalınlaşmış ve sıklıkla hiperemiktir. Hifa veya psödohifanın vasküler invazyonunu takiben hematolojik invazyon meydana gelebilir ve bu durum sistemik lezyonlara neden olabilir.

1.5. *Candida* İnfeksiyonlarında İmmunolojik Savunma

Candida infeksiyonlarında ana savunma doğal (nonspesifik) bağışıklık ile sağlanır. Ancak tam bir bağışıklığın sağlanması, doğal bağışıklık ile kazanılmış (spesifik, edinsel) bağışıklığın (humoral ve özellikle de hücresel bağışıklık) uyumlu şekilde çalışması ile oluşur (Lilic, 2002). Savunmada nötrofiller, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi nonspesifik bağışıklık hücreleri ile spesifik immün yanıtın ana hücreleri olan T lenfositler rol alır. Her ne kadar her biri herhangi bir doku bölgesinde bir dereceye kadar katkıda bulunabilse de, polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar tarafından sağlanan nonspesifik bağışıklık, kandidemiye karşı korumada baskın olurken, T hücreleri ve sitokinler tarafından sağlanan hücresel bağışıklık, ağırlıklı olarak mukozal dokuları infeksiyondan korur (Fidel, 2002). *Candida* infeksiyonlarında immünolojik olarak öncelikle nötrofiller ve aktive edilmiş makrofajlar, ana savunmayı oluşturur. Oponinler hedef hücrenin fagositozunu kolaylaştırırken, makrofajlar tarafından salgılanan İnterlökin-12 (Interleukin-12, IL-12), yardımcı T lenfosit 1'lerin (T helper lymphocyte 1, Th1) uyarımını sağlar. Uyarılmış Th1 lenfositler tarafından salgılanan interferon gama (Interferon gamma, IFN γ), tümör nekrozis faktör alfa (Tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) ve IL-2 ise makrofajların aktivasyonuna neden olur (Pohlman ve Chengappa, 2022).

Candida'lara karşı humoral savunmada, nonspesifik bağışıklık mekanizmalarından olan komplement sisteminin etkinleştirilmesi özellikle alternatif komplement yolu ve lektin yolu ile gerçekleşir. Ayrıca pıhtılaşma ve fibrinoliz sistemleri aracılığıyla dolaylı olarak da kolaylaştırılır. Bu yolla indüklenen komplement aracılı humoral savunma, kemotaksisi, opsonizasyonu ve fagositozu kolaylaştırır. Mantarların kalın hücre duvarı, onları komplement aracılı lizis gibi belirli konakçı savunmalarına karşı dirençli hale getirir de, mantar yüzeyinde oluşturulan membran atak kompleksinin (MAK) düzenleyici bir rol oynadığı, lokal ve invazif *Candida* infeksiyonları için önemli ve hızlı hareket eden bir savunma mekanizması olduğu bildirilmiştir (Shoham Levitz, 2005; Harpf vd., 2020).

Doğal bağışıklık sistemi *Candida* türleri gibi patojenlerle karşılaştığında, vücudu korumak için çok çeşitli karmaşık mekanizmalar devreye girmesini sağlar. Etkenlerde bulunan patojen ilişkili moleküler yapılar (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) bu süreçte büyük bir rol oynar. Farklı bağışıklık hücreleri, bu PAMP'ları tanıyarak immun yanıtın başlamasını sağlar. Bu özgül tanıma, patern tanıyıcı reseptörler (Pattern recognition receptor, PRR) sayesinde gerçekleşir. *Candida*'ların hem dış, hem de iç tabakasında yer alan PAMP moleküllerini tanıyan reseptörler arasında Toll-benzeri reseptörler (Toll-like receptors, TLRs) ve C-tipi lektinler (mannoz reseptörü, Dektin 1 ve 2 gibi) bulunur. TLR4; monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerde bulunur. Bu hücreler, mitojen ile aktive olan protein kinaz (mitogen-activated protein kinase, MAPK) yolları aracılığıyla proinflamatuvar sinyalleri harekete geçirerek enfeksiyonun sınırlanmasına yardımcı olurlar. Ayrıca, invazif kandidiyazise karşı koruma sağlayan Th1 lenfosit yanıtları da devreye girer. TLR2 ise hem orta düzeyde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik eder, hem de güçlü IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (Transforming growth factor beta, TGF- β) yanıtlarını uyarır. Dektin 1, IL-2, IL-10 ve Th17 yanıtlarını tetikler ve TLR2'nin etkilerini artıran bir rol üstlenir. Mannoz reseptörü (Mannose receptor, MR) ise monositler ve makrofajlarda proinflamatuvar etkileri tetikler. TNF ve Dektin 2 aktivasyonu, immünosupresif sitokin olan IL-10 üretimini destekler. Sağlıklı bireylerde mukozal yüzeyler sıkça *C. albicans* ile kolonize olur. Buradaki mukozal epitel hücreleri bir taraftan koruyucu bir bariyer oluştururken, diğer taraftan mantarları tanır. Epitel hücreleri, kommensal maya ve invazif patojen maya formları arasında ayırım yapabilen iki aşamalı bir MAPK yoluyla *C. albicans*'a yanıt verebilirler. İkinci fazdaki MAPK yolu maya tarafından değil, invazif hifalar tarafından indüklenebilir. Bu ikinci faz indüksiyonu, sitokinlerin üretimi için gerekli olan transkripsiyon faktörü (IL1, IL6) aktivasyonunu tetikler. Hifalar; inflamatuvar hücreler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinde IL-1 β üretimini uyaran ve ayrıca Th17 hücrelerini sitokinler (IL-17, IL-22) üretmeye teşvik eden bir etkiye sahiptir. IL-17 nötrofilleri aktive ederken, IL-22 epitel hücrelerinden defensin salınımını uyarır. Bu iki faktör, mukozal antifungal savunmanın kritik unsurlarıdır (Samanta, 2015).

1.6. *Candida* Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar

1.6.1. İnsanlarda *Candida* Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar

Candida türlerinin insanlarda neden olduğu infeksiyonlar ve klinik bulguların spektrumu aşağıdaki gibi tanımlanmıştır (Eggimann vd., 2003; Talapko vd., 2021):

Hematojen İnfeksiyonlar: Kandidemi, endoftalmitis, vasküler dolaşım ilgili infeksiyonlar, septik tromboflebit, infeksiyöz endokarditis, artritis, osteomyelitis, spondilodiskit, menenjitis, piyelonefritis, pulmoner kandidiyazis, hepatosplenik kandidiyazis (kronik dissemine kandidiyazis)

Non-Hematojen İnfeksiyonlar: Yüzeysel infeksiyonlar, kutanöz kandidiyazis, orofaringeal kandidiyazis, vajinitis

Derine Yerleşmiş İnfeksiyonlar: Özofageal kandidiyazis, sistitis, peritonitis, trakeitis/bronşitis

Çoğu insan infeksiyonunun kaynağı *C. albicans* olsa da, NAC türleri ile ilişkilendirilen spesifik klinik özellikler de tanımlanmıştır. Bu türlerle ilişkilendirilen yaygın klinik belirtiler Çizelge 1.5'te verilmiştir.

Çizelge 1.5: İnsanlarda bazı kandidiyazis vaka raporları (Eggimann vd., 2003)

Candida Türleri	İnfeksiyon Tipi
<i>C. albicans</i>	Mukokutanöz infeksiyonlar: orofaringeal kandidiyazis, özofajitis, vajinitis; derin yerleşimli infeksiyonlar: piyelonefritis, peritonitis; hematojen infeksiyonlar: kandidemi, menenjit ve hepatospleni kandidiyazisi
<i>C. parapsilosis</i>	Kandidemi, implante cihazlarla ilişkili derin infeksiyonlar, kontamine solüsyonlarla ilgili infeksiyonlar, yeni doğan kandidemileri
<i>C. tropicalis</i>	Bağıışıklık sistemi baskılanmış hastalarda kandidemi ve sistemik kandidiyazis, şiddetli miyalji ve miyozitis
<i>C. glabrata</i>	Sistemik kandidiyazis, kandidemi, idrar yolu infeksiyonları
<i>C. krusei</i>	Kandidemi, endoftalmitis ve yeni doğanlarda diyare
<i>C. ciferrii</i>	Onikomikozis (Tırnak Mantarı)
<i>C. dubliniensis</i>	HIV pozitif hastalarda orofaringeal infeksiyonlar
<i>C. guilliermondii</i>	İntravenöz ilaç kullananlarda sistemik kandidiyazis, endokarditis
<i>C. haemulonii</i>	Kandidemi, deri infeksiyonları
<i>C. kefyr</i>	Sistemik kandidiyazis
<i>C. lipolytica</i>	İntravenöz kateter ilişkili kandidemi
<i>C. lusitaniae</i>	Kandidemi ve yaygın infeksiyonlar
<i>C. norvegensis</i>	Böbrek nakli alıcılarında infeksiyonlar
<i>C. pulcherrima</i>	Bağıışıklığı baskılanmış hastalarda invaziv infeksiyonlar
<i>C. rugosa</i>	Yanık hastalarında sıklıkla görülen intravenöz kateter ilişkili kandidemi
<i>C. viswanathii</i>	Menenjit
<i>C. zeylanoides</i>	Kandidemi, artritis

1.6.2. Hayvanlarda *Candida* Türlerinin Yol Açtığı İnfeksiyonlar

Kandidiyazis, kanatlı hayvanlar, domuzlar, atlar, sığırlar, kediler ve köpekler başta olmak üzere birçok hayvan türünde rapor edilmiştir (Takahashi vd., 2010; Pirrone vd., 2012; Duchaussoy vd., 2015; Willems vd., 2017; Du vd., 2018; Seyedmousavi vd., 2018; Sokół vd., 2020; Shimada vd., 2021). Kanatlı hayvanlarda kandidiyazis; tavuklar, hindiler, güvercinler ve diğer kanatlı hayvanların özellikle sindirim sistemini etkileyerek ölüme neden olabilir (Osorio vd., 2007; Mugale vd., 2015). Kandidiyazis, domuzların ve tayların sindirim sistemlerinde rüptüre olabilen ülseratif lezyonlar olarak görülürken (Gelberg, 2017; Pohlman ve Chengappa, 2022), atlarda genital sistem infeksiyonları, infertilite, metritis ve abortuslara neden olur (Stefanetti vd., 2014; Satué ve Gardon, 2016). *Candida* türleri ile infeksiyonlar; süt ineklerinde ve mandalarda mastitis (Şeker, 2010; Şeker ve Özenç, 2011; Ali vd., 2021; Sav ve Öztürk, 2022), gebe ineklerde abortus (Quinn vd., 2011; Pal, 2015), kedi ve köpeklerde lokalize infeksiyonlar, oral infeksiyonlar, üst solunum yolu, gastrointestinal ve ürogenital sistem mukozalarının iyileşmeyen, ülseratif lezyonları (Quinn vd., 2011) ile karakterize edilir. Ayrıca, primatlar ve deniz memelilerinde de mukokutanöz kandidiyazis görülebileceği bildirilmiştir (Samaranayake ve Samaranayake, 2001; Takahashi vd., 2010; Pohlman ve Chengappa, 2022). Hayvanlarda *Candida* türlerinin yapmış olduğu bazı infeksiyonlar ve bu infeksiyonlar için hazırlayıcı faktörler Çizelge 1.6'da gösterilmiştir (Seyedmousavi vd., 2018).

Çizelge 1.6: Hayvanlarda kandidiyazis seçilmiş bazı vaka raporları (Seyedmousavi vd., 2018)

Konakçı	<i>Candida</i> Türleri	İnfeksiyon Tipi	Hazırlayıcı Faktörler
Kanath hayvanlar	<i>Candida</i> spp.	Oral ve gastrointestinal kandidiyazis (Güvercinler, papağanlar, Tavuklar, ötücü kuşlar, yırtıcı kuşlar)	Diğer patojenler tarafından eşlik eden enfeksiyonlar, immunsupresyon
	<i>C. albicans</i>	Pulmoner kandidiyazis (Güneş muhabbet kuşu, yırtıcı kuşlar) Miyokarditis (Kanarya), Kutanöz kandidiyazis (Ötücü kuşlar, tavuklar)	-
Köpek	<i>C. guilliermondii</i>	Eklem enfeksiyonu	Leishmaniasis ve eklem içi kortikosteroid enjeksiyonları
	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	Peritonitis, dermatitis, otitis externa	Bağırsak cerrahisi, kortikosteroidler, atopi ve diğer otoimmün hastalıklar, immünosupresif bozukluklar ve ilaçlar, diğer enfeksiyonlar
	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	İdrar yolu enfeksiyonu Kandidüri, Sistitis	Diabetes mellitus, alt idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyel enfeksiyonlar ve antibiyotik tedavisi, neoplazi
	<i>C. albicans</i> <i>Candida</i> spp.	Yaygın kandidiyazis (Endoftalmitis, perikarditis, spondilit)	Bağırsak cerrahisi, immünosupresyon, neoplazi, kateterizasyon
	<i>C. albicans</i>	Keratitis	-
	<i>Candida</i> spp.	Pnömoni	Eşzamanlı bakteriyel pnömoni ve Aspergilloz
	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. albicans</i>	İdrar yolu enfeksiyonu, Granülomatöz rinit	Kortikosteroid tedavisi Diabetes mellitus, alt idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyel enfeksiyonlar antibiyotik tedavisi, neoplazi
	<i>Candida</i> spp.	Kandidüri, Sistitis	-
	<i>C. albicans</i>	İntestinal granuloma	Şüpheli yabancı cisim yaralanması
	<i>Candida</i> spp.	Yaygın kandidiyazis (Göz tutulumu dahil)	Diabetes mellitus, immunsupresyon
Kedi	<i>C. albicans</i>	Piyotoraks	-

Çizelge 1.6: Devam

Konakçı	<i>Candida</i> Türleri	İnfeksiyon Tipi	Hazırlayıcı Faktörler
Ruminantlar	<i>C. albicans</i> <i>C. catenulata</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. kefyr</i> <i>C. krusei</i>	Mastitis	Meme içi antibiyotik tedavisi, çevre kirliliği, sağım hijyeni
Sığır	<i>C. maltosa</i> <i>C. rugosa</i> ve diğerleri		
	<i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>	Abort	-
	<i>Candida</i> spp.	Otitis externa	-
	<i>C. albicans</i>	Gastrointestinal infeksiyon	Antibiyotikler, eşzamanlı gastrointestinal infeksiyonlar
	<i>C. glabrata</i>	Yaygın kandidiyazis	Antibiyotikler, genç yaş
	<i>Candida</i> spp. <i>C. krusei</i>	Bronkopnömoni	-
Alpaka, Lama, Guanako	<i>C. albicans</i>	Yaygın kandidiyazis	İmmünosupresyon şüphesi
Deve Koyun	<i>C. albicans</i>	Dermatitis	-
At	<i>Candida</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>C. parapsilosis</i> <i>C. albicans</i> <i>Candida</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>C. guilliermondii</i>	Keratitis Artrit Endokardit Sistemik kandidiyazis Oral kandidiyazis Gastroözofageal kandidiyazis Abort	- - - Doğum hipoksisi, sepsis Genç yaş ve immun yetmezlik Genç yaş -
Domuz	<i>C. albicans</i>	Mukokutanöz kandidiyazis	Muhtemelen immünosupresyon nedeniyle viral infeksiyon

1.7. *Candida* Türlerinin Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Hayvanlarda *Candida* türlerinin neden olduğu infeksiyonların teşhisi amacıyla, etkilenen sistem ya da organlar dikkate alınarak örnekleme yapılması etkenlerin izolasyon şansını artırmaktadır. Bu amaçla, lezyonlu organ parçaları, lenf yumruları, çeşitli eksudatlar, genital akıntılar, deri kazıntısı, tırnak, apse içeriği, süt, idrar, serebrospinal sıvı, kraşe, kan, serum ve çeşitli anatomik alanlardan (ağız, burun, göz, kulak, kursak gibi) alınan sıvı örnekleri gibi çok sayıda örnek laboratuvara gönderilebilir (Raju ve Rajappa, 2011; Montes vd., 2019; Tamo, 2020; Shourie vd., 2021).

Candida infeksiyonlarının laboratuvar tanısında, gönderilen örneklerden besiyerlerine ekimler yapılarak örneklerin kültürünün yapılması ve üreyen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmesi temel yöntemler olarak kullanılmaktadır. Tür bazında identifikasyonda ise, manuel olarak klasik yöntemler veya otomatize sistemlerin kullanımı ile etkenlerin çeşitli biyokimyasal aktivitelerinin ortaya konmasını sağlayan testler yapılmaktadır. Ayrıca, gönderilen örneğin özelliğine göre antijen antikör reaksiyonlarına dayalı serolojik testlerden de yararlanılmaktadır (Tamo, 2020). İnsanlarda invazif kandidiazis vakalarında kan kültürü altın standart kabul edilse de, kültürün diğer tanı yöntemleri ile kombine edilmesinin tanı koymayı kolaylaştıracağı düşünülmektedir (Camp vd., 2020). Bu nedenle, az miktarda DNA'dan hızlı ve hassas teşhis yapabilen moleküler teknikler son derece çekici hale gelmiştir. Son yıllarda, spesifite ve sensitiviteyi değişkenlik gösterse de çeşitli moleküler tekniklerin, klasik kültürel yöntemlere kıyasla daha gelişmiş bir duyarlılık sağladığı bildirilmekte ve teşhiste moleküler teknikler de yaygın olarak kullanılmaktadır (Arda, 2015; Camp vd., 2020; Gülmez ve Alp, 2021).

1.7.1. Mikolojik Tanı Yöntemleri

1.7.1.1. Direkt Mikroskobi

Direkt mikroskobik bakı için; tırnak, deri kazıntısı, sıvap örnekleri, kraşe, doku veya hücreleri içeren örnekler genellikle %10-20'lik potasyum hidroksit (KOH) solüsyonuyla muamele edildikten sonra çeşitli boyalarla boyanmaktadır (Arda, 2015; Lemaitre vd., 2018). Kullanılan boyalar ve boyama yöntemleri arasında; Gram boyama, laktofenol pamuk mavisi ile boyama, metilen mavisi ile boyama, Giemsa, periyodik asit schiff (PAS) ile boyama, çini mürekkebi ile boyama ve Wright boyama teknikleri bulunur (Tümbay, 1999). Şüpheli örneklerin direkt mikroskop ile incelenmesi yaygın bir tanı yöntemi olmakla birlikte, farklı türlerin aynı mikroskobik morfolojiyi göstermeleri direkt mikroskobik bakı ile tanı yöntemini değersizleştirmektedir. Ayrıca, mikroskobisi yapılan örneklerin incelendiği sahada etkenlerin görülmemesi, sonucun negatif olduğu anlamına da gelmemektedir. Bu nedenle, direkt mikroskobi uygulamasının mutlaka kültürle desteklenmesi gerektiği önerilmektedir (Gülmez ve Alp, 2021).

1.7.1.2. Kültür

Candida şüpheli örneklerden *Candida* izolatlarının üretilmesinde en sık kullanılan besiyerleri pH'sı 5,5-5,6 olan Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyerleridir (Odds, 1991; Raju ve Rajappa, 2011; De Angelis vd., 2020; Acharya ve Hare, 2022). SDA hazırlanırken içerisine aseptik koşullarda gentamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklerin ilave edilmesi istenmeyen bazı mikroorganizmaların üremesini baskılamak, *Candida* türleri için seçiciliği artırmaktadır (Raju ve Rajappa, 2011, Hare, 2013; Sahoo ve Mahajan, 2016). Şüpheli örneklerden ekim yapılmış SDA petrilere, 25-30 °C'lerde aerobik koşullarda 2-3 gün (48-72 saat) inkübe edilir. *Candida* türlerinin izolasyonunda en çok kullanılan SDA'da koloniler yuvarlak, beyaz ve kıvamı kremsi koloniler oluşturlar (Samanta, 2015).

Etkenlerin izolasyonunda SDA dışında; Tween 80 ilaveli mısır unlu agar (Corn Meal Agar, CMA), %7 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agar, beyin kalp infüzyon agar,

inhibitör mold agar, yeast nitrogen agar, yeast potato dekstrozu agar ve broth da kullanılabilir (Madhavan vd., 2011; Samanta, 2015).

Son yıllarda, bazı *Candida* izolatlarının besiyerlerinde daha hızlı ve kolay tanımlanmasına yardımcı olan kromojenik besiyerleri de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kromojenik besiyerleri, mikroorganizmaların salgıladığı enzimlerle etkileşime geçerek renk değiştiren substratlar içerir. Mikroorganizmaların türlerine özgü ekzoenzimler, besiyerlerindeki substratları hidrolize eder ve sonuç olarak farklı renklerde koloniler oluşmasına yol açar. Bu özellik, belirli mikroorganizmaların belirgin bir renkte tanımlanmasını kolaylaştırırken, aynı zamanda diğer mikroorganizmalardan ayırt edilmesine de yardımcı olur (Ghelardi vd., 2008).

CHROMagar™ *Candida* (CAC, CHROMagar Company), CandiSelect™4 Agar (Bio-Rad), *Candida* Kromojenik Agar (CCA, ConDALab), Bizmut Sülfid Glikoz Glisin Maya agar (BiGGY Agar, Oxoid) ve aynı zamanda modifiye Nickerson agar olarak da bilinen *Candida* Ident Agar (Fluka) gibi farklı ticari firmalara ait çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu kromojenik besiyerlerinden CHROMagar *Candida* (CAC) ve *Candida* Kromojenik Agar (CCA) yaygın maya türlerinin hızlı bir şekilde varsayımsal olarak tanımlanmasında en sık kullanılan besiyerleri olarak bilinmekte, karışık *Candida* kültürlerini tespit etmesiyle Mikoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarındaki iş akışını kolaylaştırmaktadır. Bu besiyerleri; *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi *Candida* türlerinin kolonilerini tanımlayan diferansiyel besiyerleridir. Kromojenik besiyerlerinde, *C. albicans* genellikle parlak yeşil renkte koloniler oluştururken, *C. tropicalis* mavi ve *C. krusei* pembe renkte koloniler oluşturur. Bu sayede, besiyeri üzerindeki koloni morfolojisi ve pigmentasyon temelinde *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi türlerin %95'ten fazlası doğru şekilde tanımlanabilmektedir. Ayrıca, bu besiyerlerinin, *C. glabrata*'yı da beyaz renkte tanımlayabildiği belirtilmiştir (Pfaller vd., 1996; Aubertine vd., 2006; Devi ve Maheshwari 2014; Bayona vd., 2020).

CHROMagarın *Candida* türlerini tanımlamadaki spesifitesinin araştırıldığı bir çalışmada besiyerinin spesifitesi *C. albicans* için %96, *C. tropicalis* için %100, *C.*

krusei için %100 ve *C. glabrata* için %100 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, CHROMagar'ın, farklı *Candida* izolatlarını ayırt etmek için geleneksel yöntemlere göre daha hızlı ve güvenilir bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Devi ve Maheshwari 2014). Benzer şekilde, CandiSelect™4 Agar, BiGGY Agar, *Candida* Ident Agar, *Candida* Kromojenik Agar ve CHROMagar *Candida* gibi farklı kromojenik besiyerlerinin *Candida* türlerinin tanımlanması ve ayırt edilmesi üzerindeki etkinliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, en etkili besiyerleri CHROMagar *Candida* ve *Candida* Kromojenik agar olarak rapor edilmiştir. Araştırmada, her iki besiyerinin de üretici firma tarafından önerilen inkübasyon süresinde beklenen renkli kolonileri verdiği belirlenmiştir. *Candida* Ident Agar (modifiye edilmiş) ve CandiSelect™4 Agarın sadece üretici firma tarafından önerilen kontrol suşları için tipik sonuçlar verdiği, BiGGY Agarın ise tüm kontrol suşlarını tek bir renk aralığında gösterdiği ve ayırt edici morfolojik özellikleri belirlemede yetersiz kaldıkları vurgulanmıştır (Messeir vd., 2012).

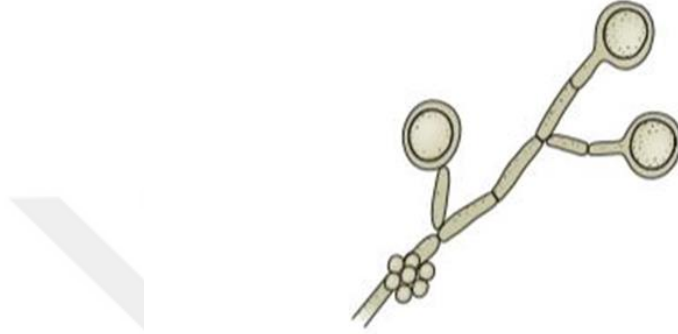
1.7.1.3. Boyama

Kanlı agar ya da SDA gibi besiyerlerinde üretilen *Candida* izolatlarının mikroskopik morfolojilerinin incelenmesinde en yaygın kullanılan boyama yöntemi Gram boyamadır. Etkenler Gram boyamada Gram pozitif kok benzeri, küre şeklinde veya oval maya hücreleri şeklinde görülürler (Arda, 2015; Deorukhkar ve Roushani, 2018).

1.7.1.4. Blastokonidya, Hifa, Psödohifa ve Klamidospor Oluşumu

Şüpheli izolatın tanımlanması için mikroskopik incelemelere dayanan çeşitli ek testler de kullanılmaktadır. Bu testler *Candida* izolatlarının morfolojik ve yapısal özelliklerini incelenmesini içeren gözlemsel yöntemlerdir. En sık incelenen yapılar, blastokonidya, hifa, psödohifa, klamidosporlar ve germ tüptür (Pincus vd., 2007). Blastokonidya, psödohifa ve hifalar, mikroskop altında taze kültürlerde incelenebilir. Bazen bu morfolojik yapıların incelenmesi için basit bir boyama işlemi gerekebilir. İncelenen yapılar *Candida* türleri hakkında fikir sahibi olunmasına yardımcı olabilir. Tween 80 ilaveli mısır unlu agarda üretilmiş *C. albicans*, septumları üzerinde üzüm salkımı

şeklinde blastokonidyum kümeleri olan uzunlamasına psöдохifalara sahiptir (Deorukhkar ve Roushani, 2018). PAS, Gomori'nin gümüşü (GMS), Papanicolaou (PAP) veya Gram boyama ile boyanmış bölgelerde hifa veya blastokonidyumların gözlenmesi, mayaların varlığı veya yokluğunu belirlemek için kullanılır (Barrett vd., 1998; Padilha vd., 2014).



Şekil 1.10: *C. albicans*'ta blastokonidyum çizimi (Markey vd., 2013)

Klamidosporlar, genellikle hifaların uçlarında veya kısa yan dallarında bulunurlar. Bu özellik, pratikte *C. albicans* ve *C. dubliniensis* gibi türlerin tespit edilmesini ve ayırt edilmesini sağlar. Klamidospor araması, besin yönünden sınırlı bir kültür ortamında gerçekleştirilir. Şüpheli koloniler 25 °C'de 24-48 saat boyunca inkübe edildikten sonra, psödomiselyumun terminal veya yan uçlarında yer alan blastosporlarla ilişkilendirilmiş, çapı 10-15 µm olan büyük, kalın duvarlı yuvarlak sporlar meydana gelir. Bu gözlem, *Candida* türlerini tanımlamak ve ayırt etmek için önemlidir (Tamo, 2020).

Klamidosporların varlığının incelenmesi için, Dalmau plak kültürü tekniği adı verilen bir test yapılır. Bu test için izole edilmiş *C. albicans* şüpheli koloni, steril öze kullanılarak Tween 80 ilaveli mısır unlu agar üzerine 45° açıyla ekilir. Agarın yüzeyi üzerine ekilen çizgileri kaplayacak şekilde bir lamel yerleştirilir. Agar 25 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda lamel ile kapalı alanlar mikroskop altında incelenir. Mikroskop altında incelenen lamel ile kapalı alanlarda klamidosporlar belirlenirse, izolatlar *C. albicans* olarak kabul edilir (Beena, 2020). Tween 80 ilaveli

mısır unlu agarda *Candida* türlerinin mikroskopik morfolojik özellikleri Çizelge 1.8’da gösterilmiştir (Walsh vd., 2018).

Çizelge 1.7: Tween 80 ilaveli mısır unlu agarda üretilen bazı *Candida* türlerinin mikroskopik morfolojik özellikleri (Walsh vd., 2018)

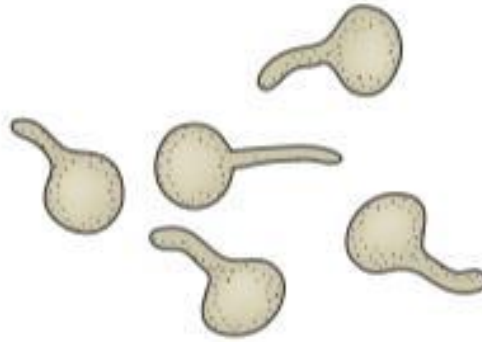
<i>Candida</i> spp.	Tween 80 İlaveli Mısır Unlu Agarda Morfolojik Özellik
<i>C. albicans</i>	Hifaların sonunda veya kısa yan dallarında klamidosporlar bulunur ve septumlarında üzüm benzeri blastokonidyum kümeleriyle uzun pseudohifalar içeren bir yapıya sahiptir.
<i>C. tropicalis</i>	Uzun hücrelerden oluşan bol dallı psöдохifalar mevcuttur. Blastokonidyumlar, misel boyunca tek başına veya küçük gruplar halinde gözlemlenir. Bazı suşlarda bulunan gerçek hifalar ve klamidosporlar, özellikle ilk izolasyonda üretilir.
<i>C. parapsilosis</i>	Psöдохifa uzun, ince ve dallıdır.
<i>C. guilliermondii</i>	Bazı suşlarda bol, bazen ise seyrek ve çok ince kısa psöдохifalar bulunur. Küçük zincirlerde veya kümeler halinde gözlenen minik blastokonidyumlar mevcuttur. Terminal uçlarda klamidosporlar gözlenmez.
<i>C. krusei</i>	Ağaç benzeri dallanma gösteren uzun, ince, düz hücreler ve blastokonidyum zincirleri bulunur.
<i>C. kefyr</i>	Çok fazla psöдохifa üretimi gözlenir.
<i>C. dubliniensis</i>	Mısır unlu agar üzerinde gerçek hifa üretimi belirgin bir şekilde mevcuttur. Bu durum, bu türün <i>C. albicans</i> 'tan ayırt edilmesine yardımcı olur. Ayrıca klamidosporlar, genellikle gerçek hifalarda kümeler halinde veya bitişik çiftler halinde bulunur. Tek veya kümelenmiş blastokonidyumların varlığı, önemli bir karakteristik özelliktir.
<i>C. glabrata</i>	Hifa veya psöдохifa olmaması karakteristik özelliktir.
<i>C. lusitaniae</i>	Çok fazla dallanmış psöдохifa görülebilir. Psöдохifa kavislidir. Bazı suşlar ilkel psöдохifaya sahiptir veya hiç psöдохifaya sahip değildir.
<i>C. rugosa</i>	Psöдохifalar, boğum aralarında bol miktarda ve blastospor ile iyi şekilde gelişmiştir.

1.7.1.5. Germ Tüp Oluşumu

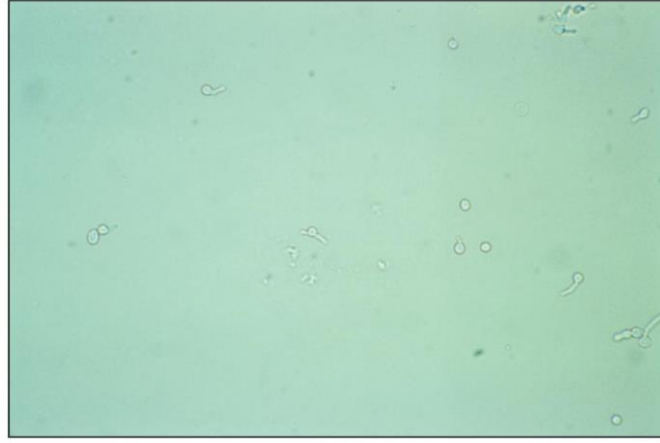
Germ tüp oluşumu, *Candida* spp.'lerin maya formundan hifal forma geçtiğinde gözlemlenen ilk uzantılardır (Staab vd., 1996; Kim vd., 2002; Rusu vd., 2014). Germ tüplerinin aranması genellikle *C. albicans*'ın tanımlanması için kullanılır. *C. albicans* izolatlarının yaklaşık %95'inin ve ayrıca NAC türleri arasında *C. dubliniensis*'in germ

tüp oluşturabilen tek tür olduğu belirtilmektedir (Sullivan vd., 1999; Raju ve Rajappa, 2011).

Germ tüp tespitinde şüpheli maya kolonisinin izole edilmesinin ardından, koloninin 0,5 ml insan serumu içerisine eklenerek bir süspansiyon hazırlanmasıdır. Bu süspansiyon, 2-3 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda, cam bir lam üzerine bir damla maya-serum süspansiyonu yerleştirilir. Daha sonra, bir lamel kullanılarak bu damla kapatılır ve düşük ışık gücüne sahip bir mikroskop altında germ tüp varlığı mikroskopik olarak incelenir. İnkübasyon süresinin sonunda, 2-3 saat içinde maya hücresinden ince uzantılarla büyüme ve çoğalma yetenekleri gözlemlenirse, test pozitif kabul edilir ve izolat *C. albicans* olarak değerlendirilir (Beena, 2020). Fotoğraf 1.2'de boyamasız bir şekilde ve $\times 40$ büyütmede germ tüpleri net bir şekilde görülmektedir (Markey vd., 2013). "Reynolds-Braude fenomeni" olarak adlandırılan germ tüp testi *C. albicans*'ın identifikasyonunda ana test sayılır. *C. albicans* şüpheli izolatların germ tüp testine pozitif sonuç vermesi durumunda, çoğu ileri tetkiklere gerek duyulmayabileceği belirtilmektedir (Jasm Mohammed ve Yassein, 2020).



Şekil 1.11: *C. albicans*'ta germ tüp oluşumu çizimi (Markey vd., 2013)



Fotoğraf 1.2: Serum örneklerinde *C. albicans*'ın boyamasız germ tüp tespiti (Markey vd., 2013)

1.7.1.6. Biyokimyasal Testler

1.7.1.6.1. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri

Mayaların karbonhidratları asimilasyon tekniği, sınırlı kaynaklara sahip teşhis laboratuvarlarında ve araştırma ortamlarında mayaların cins ve türlerini ayırt etmek için hala yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Bu yöntem, mayaların farklı karbonhidratları kullanma yeteneklerine dayanır. Sonuçlar, asimilasyon için kullanılan katı veya sıvı ortamdaki büyüme veya pH değişimi ile değerlendirilir. *Candida* spp. için karbonhidrat asimilasyon testleri Çizelge 1.8'da gösterilmiştir (Devadas vd., 2017). Mayaların karbonhidrat asimilasyon testlerinde kullanılan karbonhidratlar arasında; glukoz (Glu), laktoz (Lak, lac), sukroz (Suk, suc), maltoz (Mal), trehaloz (Tre), ksiloz (Ksi, xyl), rafinoz (Raf, Raff), sellobiyoz (Sel, Cel), galaktoz (Gal) ve dulcitol (Dul) bulunur. Bu karbonhidratlar, maya türleri arasında farklı asimilasyon profillerini ortaya çıkarır (Walsh vd., 2018). *Candida* türlerinin tespitinde kullanılan bu karbonhidrat asimilasyon testleri ayrıca ID32C gibi ticari identifikasyon kitleri ile de değerlendirilebilmektedir (Erdem vd., 2017).

Çizelge 1.8: Bazı *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan karbonhidrat asimilasyon testleri ve değerlendirilmeleri (Walsh vd., 2018)

<i>Candida</i> spp.	KARBONHİDRATLAR									
	GLU	LAK	SUK	MAL	TRE	KSİ	RAF	SEL	GAL	DUL
<i>C. albicans</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-

1.7.1.6.2. Nitrat Testi

Nitrat testi, nitrata nitrojen kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahip bazı mantar türlerinin ayrımında kullanılan bir testtir. Nitrat, hücreye alındıktan sonra nitrat ve nitrit redüktaz enzimlerinin etkisiyle amonyuma indirgenir (Cabrera vd., 2014). Nitrat testinde, mantarların nitrata indirgeme yeteneği kullanılarak, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Saprochaete* spp., *Mucor* spp. ve *Pichia* spp. gibi bazı mantar türlerinin ve cinslerinin ayrımı sağlanabilir (Kidd vd., 2022). *Candida nitratophila* ve *C. utilis* dışındaki *Candida* türleri nitrata asimile edemezler (Siverio, 2002; Navarro vd., 2003).

1.7.1.6.3. Hızlı Üreaz Testi

Candida türlerinin, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* ve *Trichosporon* türlerinden ayırt edilmesini sağlayan bir testtir. *Candida* türleri hızlı üreaz testinde negatif sonuç verirken, diğer türler teste pozitif reaksiyon verirler. Bu nedenle de, özellikle *C. albicans*, üreaz testlerinde negatif kontrol olarak kullanılır (Pincus vd., 2007; Lerm vd., 2017).

1.7.1.6.4. Hızlı Trehaloz Testi

Kromojenik agarlar, *C. glabrata*'nın renk veya agar üzerindeki morfolojik özelliklerine göre tanımlanmasında sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, genellikle *C. glabrata*'nın tanımlanması için klasik kültürel özellikler ve biyokimyasal testler gibi daha geleneksel yöntemler kullanılır. Ancak, *C. glabrata*'nın insan infeksiyonlarındaki artan prevalansı göz önüne alındığında, klinik mikoloji laboratuvarı için hızlı ve kesin bir tanı yöntemi önemlidir. Bu bağlamda, Stockman ve Roberts tarafından geliştirilen hızlı trehaloz asimilasyon testi (Rapid assimilation of trehalose, RAT) kullanılabilmektedir (Stockman ve Roberts, 1985). Bu test, *C. glabrata*'nın yalnızca bir saatlik kısa inkübasyon süresi sonunda trehalozu asimile etmesi üzerine kuruludur (Fidel vd., 1999; Lopez vd., 2001; Murray vd., 2005).

1.7.1.6.5. Tuz Toleransı Testi

Candida türlerinin virülensi, çevresel faktörlerden büyük ölçüde etkilenir. Bunlar arasında pH ve alkali metal katyonlarının konsantrasyonu da yer alır. Bunun yanı sıra, *Candida* türlerinin yüksek tuz konsantrasyonları ve diğer ozmolitlerin varlığında da gelişme yetenekleri nedeniyle ozmotolerans gösterdikleri bilinmektedir. Farklı maya türleri arasında tuz toleransı düzeylerindeki farklılıkların, özellikle patojenik *Candida* türlerinin tuz tolerans mekanizmaları ve düzenlemesinin anlaşılması için büyük öneme sahip olabileceği, ayrıca, bu konunun daha derinlemesine incelenmesinin, antifungal tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir adım olabileceği düşünülmektedir. Farklı türlerin ozmotolerans yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalarda, *C. tropicalis* ve *Candida versatilis*'in yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebildiği, *C. parapsilosis* ve *C. albicans*'ın genel olarak yüksek tuz konsantrasyonlarına daha dayanıklı olduğu, *C. glabrata*'nın *C. dubliniensis*'e göre daha yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebildiği, *C. dubliniensis*'in ise ozmotoleransı en düşük tür olduğu belirtilmiştir (Garcia vd., 1997; Silva-Graça vd., 2003; Krauke ve Sychrova, 2010).

1.7.1.6.6. Isı Toleransı Testi

Ökaryotik hücreler, çevresel değişikliklere uyum sağlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Özellikle sıcaklık değişikliklerine adaptasyon, bu hücrelerin hayatta kalması ve fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için önemlidir. *C. albicans* gibi sıcakkanlı hayvanlarda infeksiyon oluşturan türler üzerinde yapılan araştırmalar, termal adaptasyon sistemlerinin dinamik davranışları hakkında değerli bilgiler sağlamıştır (Leach vd., 2012).

Klamidospor üretimi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* arasındaki ayrımı sağlamak için kullanılan bir fenotipik özelliktir. *C. albicans*, oda sıcaklığında sınırlı sayıda klamidospor üretebilirken, *C. dubliniensis* bu sıcaklıkta yoğun klamidospor üretimine sahiptir. Her iki *Candida* türü de 37 °C'de klamidospor üretmezken, *C. dubliniensis* izolatlarının tamamı 26 °C'de 24-48 saatlik süre sonunda çok miktarda klamidospor ve psödohifa üretebilir. Bu inkübasyon sıcaklığında, *C. albicans* klamidospor ve psödohifa üretebilme yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle, düşük ısıda inkübasyonun, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* izolatları arasında ayrım yapabilmek açısından önemli bir belirleyici faktör olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Sancak vd., 2005). Başka bir araştırmada, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* izolatları SDA besiyerinde 45 °C'de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmış ve üreme açısından değerlendirilmiştir. Bu sıcaklıkta ilk 24 saatlik inkübasyondan sonra, *C. albicans*'ın %97,5'inin gelişme gösterirken, 48 saatlik inkübasyondan sonra tüm *C. albicans* izolatlarının gözle görülür bir şekilde ürediği belirlenmiştir. Ancak, 20 *C. dubliniensis* izolatından sadece üçünün 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda üreme gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, 45 °C'de üreyebilme özelliği gösteren *C. albicans*'ın *C. dubliniensis*'e daha yüksek sıcaklık toleransına sahip olduğunu, *C. dubliniensis*'in ise aynı sıcaklıkta daha sınırlı gelişim gösterdiğini vurgulamışlardır (Jan vd., 2022).

1.7.1.6.7. Hızlı Test Kitleri ile Tanı

Candida türlerinin hızlı tanısı için, germ tüp testi, klamidospor oluşumu ve karbonhidrat asimilasyon testlerine dayalı geleneksel testlerin minyatür versiyonlarını temsil eden,

ticari olarak temin edilebilen basitleştirilmiş teşhis sistemleri geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan ticari yöntemler aşağıda sıralanmıştır (Neppelenbroek vd., 2014).

- API 20C sistemi (Analytab Products, Plainview, NY, ABD)
- ID 32C sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa)
- API *Candida* sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa)
- API Yeast Identification System (Analytab Products, Plainview, NY, ABD)
- Microring YT sistemi (MYT; Medical Wire & Equipment Co., ABD)
- *Candida* ID Sistemi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa)
- Auxacolor sistemi (Sanofi Diagnostics Pasteur, Paris, Fransa)
- Uni-Yeast-Tek kit (Flow Laboratories, Inc., Baltimore, Md., ABD)
- RapID Yeast Plus Sistemi (Innovative Diagnostic Systems, Norcross, Georgia, ABD)

Yukarıda sayılan ticari identifikasyon sistemleri dışında, *Candida* izolatlarının identifikasyonunda en yaygın kullanılan yöntem MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) analiz yöntemidir (Becker vd., 2019; Delavy vd., 2019). MALDI-TOF MS analiz yöntemi, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli alternatif bir teşhis yöntemi olması nedeniyle, hızla yaygınlaşan bir analiz yöntemi olarak ön plana çıkmaktadır (Dhiman vd., 2011; Angeletti, 2017; Li vd., 2022). MALDI-TOF MS sistemi, mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin ve büyük organik moleküllerin iyonize edilerek analiz edildiği bir yöntemdir. Hedef mikroorganizmanın biyomolekülleri, bir matrise yerleştirilir ve lazer atışıyla iyonize hale getirilir. İyonize olan moleküller, elektrik veya manyetik alandan geçirilerek ayrıştırılır. Bu işlem sonucunda elde edilen iyonlar, bir uçuş süresi (time-of-flight) spektrometresiyle algılanır ve kütleli analizleri gerçekleştirilir. Bu sayede, mikroorganizmanın protein profili çıkarılır. Elde edilen profil spektrumu, sistemde bulunan referans mikroorganizmaların veri tabanı ile karşılaştırılır ve cins ve/veya tür bazında tanımlama yapılır (Wieser vd., 2012; Singhal vd., 2015).

MALDI-TOF MS sisteminin, yaygın *Candida* izolatlarının tanımlanmasında yüksek doğruluk sağladığı ifade edilmektedir. Bir araştırmada, bu sistemin 138 yaygın maya izolatını, tür düzeyinde %96,3 doğrulukla tanımlandığı, ayrıca, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* gibi türler arasında da başarılı bir şekilde ayırım yapabildiği gösterilmiştir. (Dhiman vd., 2011). Bunun yanı sıra, nadir veya yeni ortaya çıkan maya türlerinin de doğru bir şekilde tanımlanmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Lacroix vd., 2014). Günümüzde MALDI-TOF MS kullanılan çeşitli ticari sistemler arasında; MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Heidelberg, Germany) ve VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fransa) bulunmaktadır (Sampedro vd., 2018).

1.7.2. Moleküler Tanı Yöntemleri

Candida izolatlarının suş bazında tiplendirilmesi, bu etkenlerin biyolojisini, neden oldukları infeksiyonların epidemiyolojisini ve populasyon yapısını anlamak için büyük önem taşır. Bu amaçla, Deoksiribonükleik asit (DNA) temelli olmayan, geleneksel DNA temelli ve DNA temelli kesin identifikasyon yöntemleri gibi bir dizi moleküler teknik kullanılmaktadır (Saghrouni vd., 2013; Singhal vd., 2015; Arafa vd., 2023). Moleküler tanı yöntemleri, *Candida* türlerinin teşhisinde en uygun yaklaşımlar olarak bilinir. Bu yöntemler genellikle maliyetli olsa da, sağladıkları doğruluk ve hızları tartışmasızdır (Eghtedar Nejad vd., 2020; Evren vd., 2022). Günümüzde *Candida* türlerinin identifikasyonunda en sık kullanılan moleküler tanı yöntemleri arasında; Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR/PCR), multipleks (Çoklu) PZR, yuvalanmış PZR (Nested PCR), gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR), çoğaltılmış fraksiyon uzunluğu polimorfizmi (amplified fragment length polymorphism, AFLP), restriksiyon fraksiyon uzunluğu polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP), polimorfik DNA'nın rastgele çoğaltılması (random amplified polymorphic DNA, RAPD), sekans analizi ve diğer yöntemler bulunur (Eghtedar Nejad vd., 2020).

Moleküler tanı yöntemlerinden hangi yönteminin seçileceği, araştırmanın doğasına ve hedefleri göz önünde bulundurularak belirlenmelidir. Performans açısından, her bir identifikasyon tekniğinin kolaylığı, ayırt edici gücü, tekrarlanabilirliği,

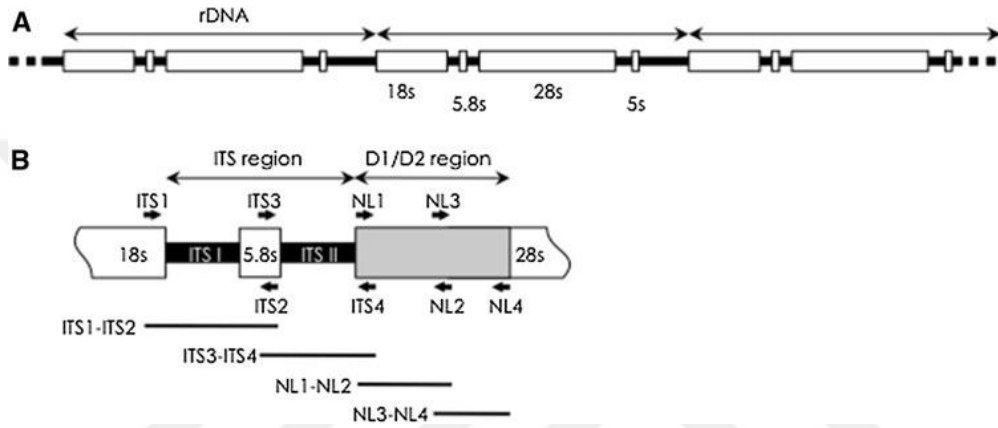
uygulanabilirliği ve sonuçların yorumlanabilirliği gibi faktörlerin değeriendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Chen vd., 2005).

1.7.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) keşfi, Moleküler Mikrobiyoloji'nin ilerleyişi için bir dönüm noktası olarak kabul edilmekte ve insan ve hayvanların infeksiyöz hastalıklarının teşhisi ve epidemiyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhu vd., 2020; Türedi ve şeker, 2023). Bu teknik, hedeflenen DNA veya Ribonükleik asit (RNA) dizilerinin sayısal olarak artırılması esasına dayanmaktadır. PZR'da hedef genetik materyal çok az sayıda olsa bile DNA veya RNA dizisi çoğaltılarak milyonlarca kopyası çıkarılabilmekte ve istenilen dizinin kolaylıkla tanımlanması sağlanmaktadır (Garibyan ve Avashia 2013; Green ve Sambrook, 2019). PZR tabanlı moleküler yöntemler kullanılan özel primerler ve probler sayesinde yüksek spesifiteye sahiptir. Geleneksel yöntemlerin yeterli olmadığı veya yavaş kaldığı durumlarda önemli bir avantaj sağlamaktadır (Trtkova ve Raclavsky 2006; Zhang vd., 2016; Magalhães vd., 2022). Klasik olarak, DNA'nın elde edilmesi ve nükleik asitlerin amplifikasyonuna dayalı PZR tabanlı yöntemler, çok esnek olup, çeşitli modifikasyonlara da olanak tanır. Bu modifikasyonlar arasında; Multipleks PZR, yuvalanmış PZR, Real-Time PZR gibi yöntemler bulunur (Neppelenbroek vd., 2014; Camp vd., 2020; Menu vd., 2021).

PZR tabanlı moleküler yöntemler için en popüler hedefler genellikle ribozomal DNA (rDNA) bölgeleridir. Bu genetik bölgeler, ribozomal DNA genlerini içeren küçük alt birim (18S), orta alt birim (5.8S) ve büyük alt birim (26S) olmak üzere üç farklı birimden meydana gelir. Ribozomal rDNA alt birimleri, yüksek derecede korunmuş alanları içerir. Bu özellik, rDNA alt birimlerini hem evrensel PZR primerleri, hem de tür veya cinse özgü primerlerin tasarlanması için mükemmel bir hedef yapar. Farklı evrensel mantar primerleri, yüksek derecede korunmuş bölgeleri hedef alarak 18S, 5.8S veya 26S rDNA bölgeleri için tasarlanmıştır. Bu primerler, 18S, 5.8S ve 26S rDNA'nın kopyalanmış aralayıcı bölgeleri (internal transcribed spacer, *ITS*) olarak adlandırılan *ITS1* ve *ITS2* bölgelerinin amplifikasyonunu gerçekleştirmek için kullanılabilir. Bu *ITS* bölgeleri, 18S ve 28S rDNA arasında bulunan ve transkripsiyon sırasında kesilen

aralayıcı bölgelerdir. Bu bölgelere göre tasarlanan primerler, mantarların genetik yapılarının farklı bölgelerini hedef alarak identifikasyonunu sağlar (Long ve Dawid 1980; Pincus vd., 2007; Alam vd., 2014; Raja vd., 2017). Son yıllarda, rDNA'nın büyük alt birimi (D1/D2 bölgesi), maya türlerinin sekans analizleri için tercih edilen bir hedef haline gelmiştir. Bu bölgenin, 600 nükleotitten oluşan değişken bir bölgeyi içerdiği ve klinik olarak önemli birçok maya türünün güvenilir bir şekilde ayrılmasını sağladığı gösterilmiştir (Kurtzman ve Robnett 1997; Taverna vd., 2013; Aydın vd., 2019).



Şekil 1.12: Fungal rDNA'nın yapısı ve evrensel primerlerin şematik diyagramı. A ile ifade edilen kısımda, 18S, 5.8S, 28S ve 5S rDNA'dan oluşan dört rDNA genleri tekrarlanır. Geniş çubuk bir kodlama bölgesini temsil ederken, ince çubuk kodlama olmayan bölgeyi temsil eder. B ile ifade edilen kısım ise ITS bölgesi ve D1/D2 bölgesidir. ITS bölgesi, ITS1 bölgesi, ITS2 bölgesi ve 5.8S rDNA'dan oluşur. Kısa oklar evrensel primerleri gösterir. Çubuklar, evrensel primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edilen DNA parçalarını gösterir (Horisawa vd., 2013)

1.7.2.2. Konvansiyonel PZR (Conventional PCR)

Konvansiyonel PZR, DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve zincir uzaması adımlarının tekrarlanmasıyla gerçekleşen, hedef DNA'nın milyarlarca kopyasının sentezlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Primerler, hedef bölgeye özgü olarak bağlanarak DNA sentezini başlatır ve DNA polimeraz enzimi yeni DNA zincirlerini oluşturur (Valones vd., 2009; Garibyan ve Avashia, 2013; Green ve Sambrook, 2019). Konvansiyonel PZR ile fungal ajanların identifikasyonunda *ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, *ITS4* ve *ITS5* primerleri en yaygın olarak kullanılan primerlerdir (Martin ve Rygiewicz, 2005;

Leaw vd., 2007; Hoang vd., 2019). En yaygın kullanılan *ITS* primerleri çizelge 1.9’da gösterilmiştir (White vd., 1990).

Çizelge 1.9: Evrensel fungal primerler (White vd., 1990)

Primer	5'→3' Nükleotit sekansı	rDNA Hedefi	Ürün uzunluğu (base pair, bp)	T_m (°C) (erime sıcaklığı, melting temperature)
<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	18S	290	65
<i>ITS2</i>	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	5.8S	290	62
<i>ITS3</i>	GCATCGATGAAGAACGCAGC	5.8S	330	62
<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	26S	330	58
<i>ITS5</i>	GGAAGCTAAAAGTCGTAACAAGG	18S	315	63

1.7.2.3. Multipleks (Çoklu) PZR

Multipleks PZR, önemli patojenik mantarların hızlı ve eş zamanlı olarak tanımlanması için daha hassas ve spesifik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Luo ve Mitchell, 2002; Carvalho-Pereira vd., 2020). Bu yaklaşım, farklı türlere özgü primerleri tek bir PZR tüpünde birleştirerek klinik açıdan avantaj sağlar. Ancak, bu tür bir tasarımın en yaygın sorunu, farklı primer dizileri arasında hibridizasyon olasılığıdır (Luo ve Mitchell, 2002).

Carvalho vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, *Candida* cinsine ait klinik olarak önemli olan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis*’in identifikasyonu için *ITS1* ve *ITS2* bölgelerinden elde edilen iki farklı parçanın kullanıldığı bir multipleks PZR yöntemi kullanılmış ve iki cins spesifik ve sekiz tür spesifik primerin kombinasyonu ile tek bir PZR reaksiyonunda amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Sunulan bu çalışmada, DNA probu veya pahalı restriksiyon enzimlerine ihtiyaç duyulmadan, sadece PZR bileşenleri ve DNA izolasyon reaktifleri gerektiren bu tekniğin maliyet açısından verimli olduğu bildirilmiştir.

1.7.2.4. Yuvalanmış PZR (Nested PCR)

Bu teknikte, *Candida* türlerinin identifikasyonunun spesifite ve sensitivitesini artırmak için iki ardışık PZR kullanılır. İlk olarak dış primerler, amplifikasyon sürecinde daha geniş bir bölgeyi hedef alırlar. Ardından, önceki reaksiyonda oluşan ürün, hedef sekansın gerçek amplifikasyonunu izlemek için kullanılır. Bu yöntem, ilk amplifikasyonda yanlış bir PZR fragmanının amplifiye edilme olasılığının düşük olması nedeniyle, daha spesifik bir teknik olarak kabul edilir. Çünkü bölgenin ikinci primer çifti tarafından tekrar amplifiye edilmesi için, spesifik hedef sekansla tam olarak eşleşmesi gerekmektedir (Khan ve Mustafa, 2001; Neppelenbroek vd., 2014; Hirschhorn vd., 2022).

Sistemik Kandidiyazise neden olan *Candida* türlerinin identifikasyonu amacıyla serum kullanan bir çalışmada, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*'nın rDNA'sındaki belirli hedefleri çoğaltmak için beş özel iç primer çifti kullanılarak Nested PZR tasarlanmış ve türe özgü *Candida* Nested PZR testlerinin tamamının %100 spesifite gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, ayrıca, diğer test edilen mantar, bakteri, parazit türleri ve insan DNA'sı arasında çapraz reaktivite gözlenmediği de vurgulanmıştır (Bougnoux vd., 1999).

1.7.2.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real-Time PCR)

Real-Time PZR, amplifikasyon sürecinin her döngüsünde amplifiye DNA'nın gerçek zamanlı miktarını belirlemeye olanak sağlayan bir PZR tekniğidir. Bu yöntemde, amplifikasyon reaksiyonunda floresan boya ile etiketlenmiş probler kullanılır. Bu amaçla en yaygın tercih edilen floresan boya SYBR Green'dir. Bu boya, DNA'nın çift sarmal yapısına bağlanıp floresans yayarak amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlar. Bu sayede amplifikasyon reaksiyonunun hangi döngüsünde DNA miktarının arttığı ve reaksiyonun ne zaman doygunluğa ulaştığı gibi bilgiler elde edilebilir (Trtkova ve Raclavsky, 2006; Cao ve Shockey, 2012; Kralik ve Ricchi, 2017). PZR amplifikasyonunu ve floresan tabanlı tespiti aynı reaksiyon tüpünde birleştiren Real-Time PZR, geleneksel PZR'ye kıyasla kontaminasyon riski sınırlanmış bir

tekniktir (Pincus vd., 2007; Nabili vd., 2013). *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan Real-Time PZR, farklı prob ve floresan sinyal algılama yöntemlerine dayanan çeşitli versiyonlara sahiptir. Hidroliz probu tabanlı Real-Time PZR versiyonları arasında TaqMan, Beacons ve Scorpions proplarını içeren çeşitler bulunmaktadır. Hibridizasyon probu tabanlı Real-Time PZR versiyonları arasında ise en yaygın kullanılan LightCycler'dir (Pincus vd., 2007; Foongladda vd., 2014; Nehdi vd., 2020).

Bir araştırmada *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* ve *C. glabrata* gibi klinik izolatların identifikasyonu için türe özgü primer ve TaqMan™ prob setleri ile Real-Time PZR kullanılmıştır. Çalışmada, problar farklı floresan boyalar ile etiketlenmiş, bu sayede, testlerin spesifitesi bir dizi patojenik mantar koleksiyonu suşuna, klinik izolatlara ve çeşitli maya, bakteriyel ve viral patojenlere karşı değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, primer ve prob setlerinin kendi türleri için %100 spesifite gösterdiğini ve basit ekstraksiyon yönteminden sonra gerçekleştirilen Real-Time PZR'la belirtilen altı türün tanımlanmasının 4-6 saat içinde tamamlanabildiğini bildirmişlerdir (Guiver vd., 2001). Selvarangan vd. (2003) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, *Candida* türlerinin identifikasyonu için LightCycler yazılımı kullanılarak Real-Time PZR yaklaşımının başarıyla uygulandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, hedeflenen altı *Candida* türü olan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae* için kullanılan yöntemin %100 spesifite ve %100 sensitiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

1.7.2.6. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting Analysis, HRM)

Yüksek çözünürlüklü erime analizi (HRM), mutasyonları, polimorfizmleri ve epigenetik bilgileri tespit etmek için kullanılan etkili bir moleküler yöntem olup, aynı zamanda farklı organizma türlerini belirlemek için erime eğrilerinin göreceli konumlarını ve şekillerini karşılaştırır (Nemcova vd., 2015). Real-Time PZR'ın ardından uygulanan HRM analizi, özellikle klinik numunelerden *Candida* türlerinin tespiti ve doğru identifikasyonu için güvenilir, hızlı ve basit bir teknik olarak bildirilmiştir (Eghtedar Nejad vd., 2020). Bu analiz yöntemi, *Candida* cinsinin evrimini daha iyi anlamak,

Candida türlerini belirlemek ve bazı gen ailelerinin evrimsel yollarını ortaya çıkarmak için filogenetik analizle birlikte kullanılmaktadır. Bu çalışmalar, *Candida*'ların moleküler tanısının yapılması ve genetik çeşitliliğinin araştırılması açısından önem taşımaktadır (Diezmann vd., 2004; Tong ve Giffard, 2012).

1.7.2.7. DNA Dizi Analizi (Sekans Analizi) ve Filogenetik Analiz

DNA tabanlı moleküler tekniklerin hassasiyeti; numune hazırlama, primer tasarımı ve hedef DNA seçimi, DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyon yöntemleri gibi faktörlere bağlıdır (Bretagne ve Costa, 2005; Gupta, 2019). Amplifikasyon yönteminin başarısı, hedeflenen nükleik asidin seçimine bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. *Candida* türlerini ayırt etmek için, 5.8S, 18S ve 28S rDNA genlerinin yüksek oranda korunmuş sekansları tercih edilir. Bu amaçla, genellikle *ITS1* ve *ITS2* bölgeleri kullanılır. Bu iki korunmuş bölgenin, tek başına kullanıldığında bile başarılı sonuçlar verebildiği, ancak, birlikte kullanımlarının daha iyi sonuçlar sağlayabildiği belirtilmektedir (Chen vd., 2001; Bengtsson-Palme vd., 2013; Yang vd., 2018). DNA dizi analizi veya sekanslama, PZR ile çoğaltılan hedef DNA bölgesinin nükleotit diziliminin belirlenmesi işlemidir. Bu analizler, otomatize sistemler kullanılarak gerçekleştirilir. DNA dizi analizi cihazları, elektroforez sistemleri ve sabit bilgisayarlarda yüklü olan programlar içerir. DNA molekülünde bulunan farklı bazlar floresan boyalarla işaretlenir. İşaretli DNA dizileri, elektroforez yoluyla ayrıştırılır ve lazer ışını altında bulunan bir dedektör kamera, nükleotidlerin verdiği floresan ışımayı kaydeder. Bu kaydedilen veriler daha sonra değerlendirilir ve grafiksel veya matematiksel yöntemlerle analiz edilir. DNA dizi analizi cihazları, 1400 baza kadar okuma yapabilme kapasitesine sahiptir. Elde edilen nükleotid dizileri, gen bankalarının veri tabanlarındaki mikroorganizma dizileriyle karşılaştırılarak incelenen mikroorganizmanın tür düzeyinde identifikasyonu sağlanır (Domán vd., 2022; Evren vd., 2022).

Candida spp.'lerin teşhis edilmesi ve identifikasyonlarında geleneksel bakteriyolojik tanı yöntemlerine göre daha az zaman ve iş gücü gerektirerek hızlı sonuçlar elde edebilen PZR tabanlı yöntemler, spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu ve DNA dizisinin analizi yoluyla tür düzeyinde identifikasyonu sağlayabilir. DNA dizi

analizi, doğru tür identifikasyonu için kabul edilen altın standarttır. Ancak bu yöntem nispeten maliyetli olabilmekte ve klinik laboratuvarlarda yaygın olarak bulunmamaktadır (Yiş ve Doluca, 2018). Klasik zincir sonlandırma prensibine dayanan Maxam-Gilbert ve Sanger sekanslama metodu ile yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS) yöntemi olmak üzere iki temel DNA dizileme yöntemi bulunmaktadır (Bansal vd., 2018; Gupta ve Verma, 2019; Türedi ve Şeker, 2023).

Maya türlerinin tanımlanmasında *ITS* bölgelerinin sekans analizinin kullanıldığı bir çalışmada, 299 referans suşun 290'ının (%97) *ITS1* bölgesi kullanılarak ve 298'inin (%99,7) *ITS2* bölgesi kullanılarak doğru şekilde tanımlandığı bildirilmiştir. Araştırmada, *ITS2* dizisinin *ITS1* dizisine göre daha fazla türe özgü olduğu vurgulanmış ve klinik açıdan önemli olan türlerin hemen hemen tamamının, bilinmeyen türlere karşılık gelen *ITS2* dizilerinin GenBank veri tabanında anlamlı bir şekilde mevcut olduğu belirtilmiştir (Leaw vd., 2006).

Filogenetik, ortak soydan gelen organizma soyları veya onların gen bölgeleri arasındaki evrimsel ilişkiyi açıklamayı hedeflemiştir. Filogenetik analizlerde kullanılan en yaygın veri tipi, DNA ve amino asit dizisi sekanslarıdır (Brinkman ve Leipe, 2001; Sarıçam ve Müştak, 2015). Filogeniyi çıkarmak için genom ve proteinlerin hizalanmış dizileri arasındaki farklar ölçülür ve bir ağaç formunda gösterilir. Filogenetik ağaçlar, tür içi değerlendirmeler, karşılaştırmalar ve uyum hesaplamaları için verilerin görsel olarak anlaşılabilmesini sağlar (Gorbalenya ve Lauber, 2017). Bakteriler için filogenetik analizlerde en sık 16S rDNA kullanılmakta, maya izolatları için 26S rDNA ve 5.8S *ITS* rDNA bölgeleri (D1/D2 bölgesi) kullanılmaktadır (Kurtzman ve Robnett, 1998; Hayashi vd., 2013; Church vd., 2020; Awandkar vd., 2023). Filogenetik ağaç oluşturmada mesafe temelli yöntemler ve karakter temelli yöntemlerden oluşan iki ana yöntem kullanılır (Munjal vd., 2019). Mesafe temelli yöntemlerden, kümelenme temelli algoritmalar; aritmetik ortalama ile ağırlıksız çift grup yöntemi (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) ve komşu birleştirme yöntemi (Neighbor Joining, NJ) olarak ikiye ayrılır. En iyi durum temelli algoritmalar Fitch-Margoliash yöntemi ve minimum evrim yöntemi (minimum evolution) olarak sınıflandırılır.

Karakter temelli yöntemler ise, maksimum parsimoni, maksimum olabilirlik (maximum likelihood) ve Bayesian analizi olarak üçe ayrılır (Sarıçam ve Müştak, 2015).

Çizelge 1.10: Filogenetik ağaç yöntemlerinin sınıflandırılması (Sarıçam ve Müştak, 2015)

Filogenetik Ağaç Yöntemleri		
Mesafe Temelli Yöntemler		Karakter Temelli Yöntemler
Kümelenme temelli algoritmalar	En iyi durum temelli algoritmalar	Maksimum parsimoni
UPGMA	Fitch-Margoliash yöntemi	Maksimum olabilirlik
NJ	Minimum evrim yöntemi	Bayesian analizi

1.8. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonların Sağaltımında Antifungal Ajanlar

Mantar hücre membranının fosfolipit tabakası; transport proteinleri, reseptör proteinleri ve sinyal proteinleri gibi özelleşmiş proteinlere sahiptir. Bu proteinler dış çevrenin algılanması, çeşitli işaretlerin verilmesi, çözünmüş maddelerin alınması, endositoz, ekzositoz, membranın büyümesi, hücre duvarının tamiri ve sentezi gibi görevler yaparlar. Bu görevlerinden dolayı hücre membran proteinleri antifungal ilaçların hedef noktalarıdır (Reiss, 2001; Mazu vd., 2016; Sant vd., 2016).

İnfeksiyonların sağaltımında kullanılan antifungal ajanların etki mekanizmaları; hücre duvarına etki edenler, hücre membranına etkili olanlar ve nükleik asit sentezini inhibe edenler olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir (Cherry vd., 2013).

1.8.1. Hücre Duvarına Etkili Ajanlar

1.8.1.1. Ekinokandinler

Ekinokandinler, mantar hücre duvarının bütünlüğünü sağlayan anahtar bir enzim olan β -1,3-D-glukan sentezini inhibe ederek etki gösteren antifungal ilaç sınıfını oluşturur. Mantar hücre duvarında mevcut olan β -1,3-D-glukan, memeli hücrelerinde bulunmadığından ekinokandinler mantarlara özgüdür ve seçicilik gösterirler (Curto vd., 2021; Szymański vd., 2022). Kaspofungin, ekinokandinler sınıfında onaylanan ilk antifungal ilaçtır (DiNubile vd., 2004). Daha sonra, mikafungin ve anidulafungin de bu sınıfta onay alan diğer antifungaller olmuştur (Kofla ve Ruhnke, 2011). Ekinokandinlerin, özellikle *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'ye karşı etkili fungisidal aktivite sergiledikleri, ayrıca, amfoterisin B'ye ve flukonazole dirençli *C. glabrata* türlerine karşı da etkili olabildikleri bildirilmektedir (Grover, 2010). Ekinokandin direnci yaygın olmamakla birlikte, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* izolatlarında bildirilmiştir (Hernandez vd., 2004; Moudgal vd., 2005; Perlin, 2015; Pristov ve Ghannoum, 2019).

1.8.2. Hücre Membranına Etkili Ajanlar

1.8.2.1. Polyen Grubu Antifungal Ajanlar

Polyen grubu antifungal ajanlar, mantar hücre membranının yapısal bir bileşeni olan ergosterolü ve ergosterol sentezini hedef alırlar. Polyen grubu antifungaller mantar hücre zarında bulunan ergosterol ile etkileşime girerek kanallar oluşturur. Bu kanallar, hücre zarının genişlemesine ve geçirgenliğinin artmasına neden olur. Sonuç olarak hücre içi potasyum ve diğer moleküller hücre dışına sızar. Bu durum, mantar hücresinin iç dengesinin bozulmasına ve mantarın ölümüne yol açar (Odds vd., 2003, Hoehamer vd., 2010; Kristanc vd., 2019). Bu grupta bulunan antifungallere ait etken maddeler *Streptomyces* bakterileri tarafından üretilir (Vandeputte vd., 2012). Günümüzde kullanımda olan başlıca polyen grubu antifungal ajanlar arasında amfoterisin B, natamisin ve nistatin bulunur (Ashbee ve Gilleece, 2014). Amfoterisin B'nin, etki

mekanizmasından dolayı memeli hücreleri için toksik etkili olabileceği ve özellikle nefrotoksisiteye neden olabileceği bildirilmiştir (Dupont, 2002; Laniado-Laborín ve Cabrales-Vargas, 2009; Kagan vd., 2012). *Candida* ve *Aspergillus* gibi mantar türleri üzerinde etkili olan nistatinin de memeli hücreleri için toksik etkiye sahip olduğu, bu nedenle de, sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde intravenöz kullanımının kısıtlı olduğu bilinmektedir (Sousa vd., 2023). Son dönemde, toksisiteyi azaltmak amacıyla geliştirilen daha az toksik liposomal nistatin formülasyonu kullanıma sunulmuştur (Larson vd., 2000; Sousa vd., 2023). Polyen grubu antifungallere karşı direnç gelişimi, bu ilaçların zarın temel bir yapısal bileşenini hedef alması nedeniyle çok yaygın değildir (Serhan vd., 2014). *C. albicans* ve *C. glabrata* gibi birçok yaygın mantar patojeninde amfoterisin B direnci nadir görülürken, *C. lusitanae* ve *C. guilliermondii* gibi türlerin ise hücre zarlarında ve ergosterol sentezindeki yapısal farklılıklar nedeniyle, amfoterisin B'ye doğal dirençli olabilecekleri düşünülmektedir (Barker ve Rogers, 2006; Spampinato ve Leonardi, 2013).

1.8.2.2. Azol Grubu Antifungal Ajanlar

Azol grubu antifungaller, mantarlara özgü ergosterolün biyosentezinde rol oynayan bir enzim olan ve *ERG11* geni tarafından kodlanan 14- α -sterol demetilazı inhibe ederek etkilerini gösterirler (Whaley vd., 2017). Azol grubu antifungal ajanlar, azol halkasındaki nitrojen atomlarının sayısına bağlı olarak iki farklı grupta sınıflandırılır. Azol halkasında iki nitrojen atomu bulunanlar imidazoller olarak isimlendirilir. Bu grupta; mikonazol, klotrimazol, tiokonazol, ekonazol, ketokonazol ve izokonazol gibi antifungal ilaçlar bulunur. Azol halkası üç nitrojen atomu içerenler ise triazoller olarak isimlendirilir. Bu grupta birinci kuşak olarak flukonazol ve itrakonazol gibi ilaçlar yer alırken, yeni kuşak olarak da vorikonazol ve posakonazol gibi antifungaller bulunmaktadır (Sienkiewicz vd., 2016).

İmidazol grubu antifungallerden; klotrimazol, ekonazol ve mikonazol 1960'ların sonlarında tedavi için klinik kullanıma uygun hale gelmiştir. Ancak oral olarak uygulandıklarında yüksek toksisiteyi nedeniyle, kullanımları topikal uygulama ile sınırlandırılmıştır. Mikonazol 1968'de, parenteral yolla kullanım için mevcut olan ilk

antifungal olmuş, ancak toksisitesi ve mantar türleri arasındaki etkisinin nispeten sınırlı olması nedeniyle kullanımı azalmıştır. Ketokonazol ise, 1981'de antifungal olarak kullanımı onaylanmış bir ilaçtır. Azol grubu antifungallerin oral olarak uygulandıklarında zayıf bir şekilde emildikleri ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda serebrospinal bariyeri geçemedikleri, bu nedenle de etkinliklerinin azaldığı belirtilmektedir. Ayrıca testosteron veya glukokortikoid üretiminde azalmaya neden oldukları ve karaciğer ile gastrointestinal sistemde bazı ciddi yan etkileri bulunduğu bildirilmiştir (Vandeputte vd., 2012).

Flukonazol, 1990 yılında kullanılmaya başlanmış ve imidazol grubundaki antifungallerin kullanımına göre birçok avantaj sağlamıştır. Flukonazol yüksek oranda suda çözünmesi nedeniyle kolayca intravenöz olarak enjekte edilebilir. İtrakonazol, 1992'de onaylanmış ve klinik kullanıma sunulmuştur. İtrakonazol mantar türleri arasında flukonazolden daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Yeni kuşak triazol grubu antifungal ajanlar olan vorikonazol ve posakonazol ise sırasıyla 2002 ve 2006'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmıştır. Ravukonazol şu anda ilaç geliştirmenin klinik deneme aşamasındadır (Yamaguchi, 2016; Ishii vd., 2018). Yeni kuşak triazoller geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir. *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Scedosporium* spp., *Acremonium* spp., *Trichosporom* spp., dimorfik mantarlar, dermatofitler ve *Cryptococcus neoformans* gibi birçok mikroorganizma üzerinde etkilidirler (Chiou vd., 2000; Sabo ve Abdel-Rahman, 2000; Vandeputte vd., 2012).

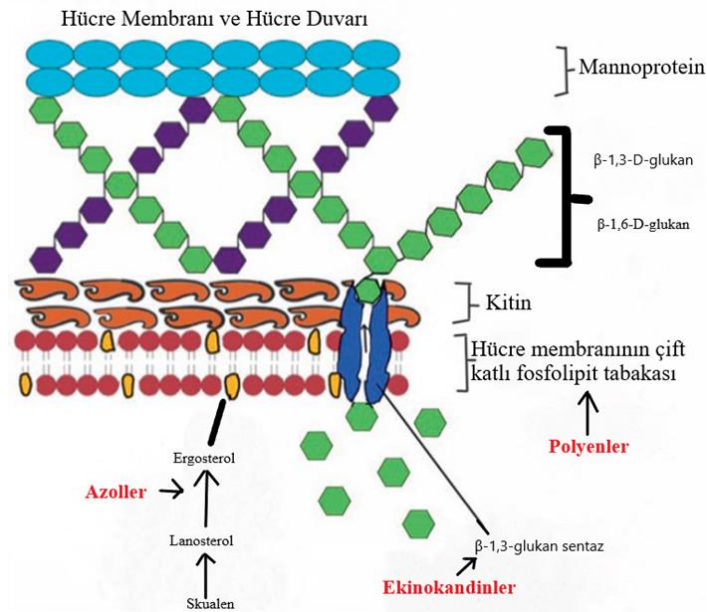
Sınırlı antifungal ajanlar içinde, azol grubu antifungaller *Candida* infeksiyonlarını tedavi etmek için en sık kullanılan sınıftır. Flukonazol, ucuz olması, sınırlı toksisite göstermesi ve oral uygulama için mevcut olması nedeniyle birçok *Candida* infeksiyonu için sıklıkla tercih edilen bir antifungaldir. *C. krusei* ve *C. glabrata*'nın, flukonazole doğal dirençli olduğu bilinmektedir (Xiao vd., 2015; Nami vd., 2019; CLSI, 2022). *C. parapsilosis* izolatlarının %2-5'inde, *C. tropicalis* izolatlarının ise %83'ünde flukonazole direnç gelişimi tespit edilirken, *C. albicans* izolatlarındaki direnç oranının neden olduğu infeksiyona bağlı olarak değiştiği ve en

yüksek direnç oranının orofarengeal kandidiyazis vakalarından elde edildiği belirtilmiştir (Xiao vd., 2015; Whaley vd., 2017).

1.8.3. Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Ajanlar

1.8.3.1. Nükleozid Analogları

Nükleozid analogları sınıfında yer alan flusitozin (5-fluorositozin, 5-FC), hedef hücrelerde RNA'ya dahil olarak mantar hücrelerinde erken zincir sonlanmasına neden olan 5-florourasil'e dönüşen bir ilaçtır. Flusitozinin dönüştüğü 5-florourasil, timidilat sentaz enzimini inhibe ederek DNA sentezini engeller ve mantar hücrelerinin gelişmesini ve çoğalmasını inhibe eder (Odds vd., 2003; Delma vd., 2021). *Candida* cinsi içinde klinik izolatların genelinde %7-8 oranlarında flusitozine direnç gelişebildiği, ancak *C. albicans* dışındaki türler de dikkate alındığında bu oranın %22'ye çıkabildiği bildirilmektedir (Vandeputte vd., 2012). Bunun yanı sıra, *C. tropicalis*'te olduğu gibi antifungal kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan dirençli mutantların da flusitozine karşı dirençte etkili olabildikleri belirtilmektedir (Vandeputte vd., 2012; Delma vd., 2021).



Şekil 1.13: Antifungallerin etki şekillerinin hücre üstünde gösterimi (Chakrabarti ve Sethuraman, 2017)

Çizelge 1.11: *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungal etken maddeler ve etki mekanizmaları

Etki mekanizması	Grup	Etken Madde
Hücre duvarına etkili ajanlar	Ekinokandinler	Anidulafungin Kaspofungin Mikafungin
Hücre membranına etkili ajanlar	Polyenler	Amfoterisin B Natamisin Nistatin
	İmidazoller	Ketokonazol Mikonazol Klotrimazol Tiokonazol Ekonazol İzokonazol
	Triazoller	Flukonazol İtrakonazol Vorikonazol Posakonazol
Nükleik asit sentezini inhibe eden ajanlar	Nükleozid analogları	Flusitozin

1.9. Süt İnekleri ve Anadolu Mandalarında Mastitis

Mastitis; infeksiyöz veya infeksiyöz olmayan etiyolojiye sahip, meme bezlerinin yangısı olarak tanımlanmaktadır (Shaheen vd., 2016; Beniç vd., 2018; Cheng ve Han, 2020). Mastitise zemin hazırlayan infeksiyöz olmayan nedenler arasında yetersiz hijyen, kötü bakım ve besleme, aşırı kalabalık yetiştiricilik, yetersiz havalandırma, uygun olmayan sağım teknikleri ve sağım makinalarının hatalı kullanımı gibi çevresel faktörler önemli yer tutar (Fagiolo ve Lai, 2007; Abed vd., 2021). Ayrıca meme başı derisi, meme başı kanalı ve meme sarnıcı gibi memenin infeksiyona karşı normalde etkili olan bariyerlerini olumsuz etkileyen faktörler de, memeyi mastitise yatkın hale getirir (Cheng ve Han, 2020; Mukherjee vd., 2023). Mastitisin infeksiyöz nedenleri olarak ise; bakteriler, Mikoplazmalar, mantarlar, mayalar ve algler gösterilmiştir (Bradley, 2002;

Moreira vd., 2019; Krukowski vd., 2020; Kurt ve Ekşi, 2021). Mastitisin ekonomik açıdan süt hayvanlarının en önemli hastalığı olduğu ve süt ineklerinde hastalık maliyetlerinin %38'ine direkt etki ettiği bildirilmiştir (Larson vd., 2000; Cheng ve Han, 2020; Tommasoni vd., 2023). Kronik mastitisin aylık maliyeti 180 avro olurken mastitise bağlı satılamayan sütler, buzağların beslenme maliyetleri ve tedavi giderleri hesaplandığında laktasyonun erken dönemlerinde meydana gelen ve toplam mastitisin maliyetinin aylık 230 avro olduğu hesaplanmıştır (Bonestroo vd., 2023).

Süt ineklerinde mastitisin etiyolojisine yönelik yapılan pek çok çalışmada, klinik ve subklinik mastitisin dominant etkeni olarak *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* bildirilmiştir (Sharma vd., 2012; Lundberg vd., 2016; Mbindyo vd., 2020; Kaczorek-Łukowska vd., 2021; Khasapane vd., 2023). Bu çalışmalarda, *Staphylococcus* cinsi içerisinde *S. aureus*'un genellikle ana etken olduğu, bu etkeni *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus* ile koagulaz negatif *Staphylococcus* (KNS) türlerinden *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri* ve *Staphylococcus chromogenes*'in izlediği belirtilmiştir (Becker vd., 2014; Getahun vd., 2023; Kansaen vd., 2023; Seker vd., 2023). *Streptococcus* cinsi içerisinde ise temel patojenin *Streptococcus agalactiae* olduğu ve bu patojeni *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis*'in takip ettiği rapor edilmiştir (Kaczorek vd., 2017; Cheng ve Han, 2020; Kabelitz vd., 2021; Smistad vd., 2023). Mastitis etiyolojisinde önemli olan bu ana patojenler dışında, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türleri de çevresel mastitislerin ana etkenlerini oluşturmaktadır (Azevedo vd., 2016; Shiferaw ve Telila, 2017; Klaas ve Zadoks, 2018; Gelgelu vd., 2023). Süt ineklerinde en önemli sağlık problemlerinden olan mastitisin infeksiyöz nedenleri arasında genellikle bakteriler sorumlu olarak gösterilmekle birlikte, mastitis mantarlara bağlı olarak da oluşmaktadır (Bakr vd., 2015; Cilvez ve Turkeyilmaz, 2019; Cobirka vd., 2020; Kurt ve Ekşi, 2021; Mohamed vd., 2022; Yüksel Dolgun vd., 2022; Awandkar vd., 2023). Mantarlara bağlı mikotik mastitislerin görülme sıklığı genellikle düşük olarak kabul edilse de, mikotik mastitisler bazen aynı anda birçok hayvanda görülen ve bulaşıcı nitelikteki epizootik salgınlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Krukowski ve Saba,

2003; Seyedmousavi vd., 2018; Awandkar vd., 2023; Radzikowski vd., 2023). Süt ineklerinde mikotik mastitis etkenleri arasında *Candida* türleri özellikle son yıllarda yaygın şekilde izole edilmektedir (Şeker, 2010; Eldesouky vd., 2016; Du vd., 2018; Hizlisoy vd., 2020; Kurt ve Ekşi, 2021; Yüksel Dolgun vd., 2022; Awandkar vd., 2023).

Krishnaswamy vd. (1965) mandaların meme başı sfinkterinin, ineklerin meme başı sfinkterine göre mikroorganizma istilasına karşı daha iyi bir bariyer oluşturacak şekilde düz kas lifine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Mandaların anatomik olarak uzun ve dar meme ucu kanalına sahip olmalarının, mikroorganizmaların memeyi istila etmesini engelleyebileceği düşünülmüştür (Moroni vd., 2006, Ozenc vd., 2020). Ancak, ineklerle kıyaslandığında mandaların daha sarkık ve uzun meme başına sahip olmalarının, bu hayvanlarda mastitis gelişimi için risk faktörü olduğunu belirten araştırmacılar da bulunmaktadır (Moroni vd., 2006; Fagiolo ve Lai, 2007; Kaur vd., 2018). Geleneksel olarak, mandaların ineklere göre mastitise daha dirençli oldukları düşünülmekle birlikte, manda sütünün yüksek besin içeriği nedeniyle mikroorganizmalar için hızla üremeye uygun bir ortam sağlayabileceği de belirtilmektedir (Fagiolo ve Lai, 2007; Pisanu vd., 2019). Mandalarda görülen mastitislerden en sık izole edilen bakteriyel etkenler arasında *S. agalactiae*, *S. aureus*, *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*), *Mycoplasma* spp., *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli* ve Enterobacteriaceae familyasındaki diğer türler ve KNS türleri yer almaktadır (Fagiolo ve Lai, 2007; Javed vd., 2015; Sharma vd., 2018; Ali vd., 2021; Tuzcu vd., 2023). Mandalarda mikotik mastitis ajanları olarak ise özellikle *Candida* türleri önemli bir yer tutmaktadır (Özenç vd., 2008; Şeker ve Özenç, 2011; Ali vd., 2021; Mohamed vd., 2022; Hassan vd., 2023).

1.10. Mastitis Sınıflandırması

Mastitis tiplerinin sınıflandırılması; neden olan patojenlere, klinik belirtilere, belirtilerin şiddetine, süresine, meme dokusu hasarına ve yangının durumuna bağlı olarak klinik form ve subklinik form olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir (Argaw, 2016; Sharun vd., 2021). Klinik görünümüne göre mastitis; şiddetine, başlangıç hızına ve süresine göre; perakut, akut, subakut, subklinik ve kronik form olarak sınıflandırılır

(Cheng ve Han, 2020; Sarma ve Hussain, 2021). Gram pozitif bakteriler olan *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türleri hem klinik hem de subklinik mastitislerin dominant bakterileridir (Holm ve Jespersen, 2003; Botrel vd., 2010; Dieser vd., 2014; Kurt ve Ekşi, 2021).

1.10.1. Etkenlere Göre Mastitis Sınıflandırılması

Mastitislere neden olan etkenler; bulaşıcı (kontagiyöz) mikroorganizmalar, fırsatçı (oportünistik) mikroorganizmalar, çevresel mikroorganizmalar ve nonspesifik infeksiyon etkenleri olarak ayrılabilir (Hamadani vd., 2013; Vural vd., 2016).

1.10.1.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Mastitis Etkenleri

Bulaşıcı mastitis patojenleri, meme bezinde yerleşerek meme dokusuna zarar veren etkenlerdir. Bu tür patojenler hem subklinik hem de klinik mastitise neden olur (Bradley, 2002; Cheng ve Han, 2020; Cobirka vd., 2020). Bulaşıcı mastitis, sağım yoluyla bir memeden diğerine veya bir inekten diğerine yayılabilir (Argaw, 2016; Cobirka vd., 2020). Bulaşıcı mastitise neden olan etkenler arasında *S. aureus* ve metisiline dirençli *S. aureus* (methicillin resistant *S. aureus*, MRSA), *S. agalactiae*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma* türleri yer almaktadır (Francoz vd., 2012; Cheng ve Han, 2020; Zeconi vd., 2020; Shoaib vd., 2021; Magro vd., 2023). Bu patojenler arasında özellikle, *S. aureus* ve MRSA türleri dünyada subklinik ve kronik inek mastitislerinin en yaygın bulaşıcı nedenleridir (Fox ve Gay 1993; Vanderhaeghen vd., 2010; Magro vd., 2017; Omara, 2017; El-Ashker vd., 2020; Campos vd., 2022; Shahid vd., 2023).

1.10.1.2. Fıratçı (Oportünistik) Mastitis Etkenleri

Fıratçı mastitis etkenleri, meme başı kanalında ve derisinde bulunan fırsatçı patojenlerdir. Patojenik olmadığı düşünölen normal flora üyeleri, memeyi istila edebilir, konakçı bağışıklık sistemini uyarabilir ve subklinik veya hafif klinik mastitise neden

olabilirler (Kulkarni ve Kaliwal, 2013). Fırsatçı mastitise neden olan dikkate değer patojenler arasında; *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* ve *S. chromogenes* gibi KNS türleri bulunmaktadır (De Vliegher vd., 2003; dos Santos Nascimento vd., 2005; Getahun vd., 2023; Kansaen vd., 2023; Umar vd., 2023). *Candida* türlerinde fırsatçı patojenler olarak kabul edilen türler arasında *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. zeylanoides*, *Candida guilliermondii* ve *C. rugosa* bulunmaktadır (Zaragoza vd., 2011; Dworecka-Kaszak vd., 2012; Du vd., 2018; Cilvez ve Turkeyilmaz, 2019).

1.10.1.3. Çevresel Mastitis Etkenleri

Çevresel mastitis etkenleri, genellikle deri yüzeyinde veya memede doğal olarak bulunmayan, ancak hayvanlar kontamine bir ortamla temas ettiğinde meme kanalına giren organizmalardır. Bu tür mastitisin temel kaynağı, hayvanların temas ettiği ve yaşadığı çevredir (Hamadani vd., 2013). Çevresel mastitise neden olan bakteriler arasında en yaygın olanları Koliform grubu bakteriler (özellikle *E. coli* ve *Klebsiella* spp.), *Enterococcus* türleri (özellikle *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*), *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equinus* ve *Streptococcus parauberis* gibi çevresel *Streptococcus* türleri ve *T. pyogenes*'dir (Hamadani vd., 2013; Bi vd., 2016; Kabelitz vd., 2021).

1.10.2. Klinik Semptomlarına Göre Mastitis Sınıflandırması

1.10.2.1 Klinik Mastitis

Klinik mastitis, meme bezindeki patolojik değişikliklerle birlikte sütte kan, su, pıhtı, fibrin ve ölü hücrelerden oluşan parçaların varlığıyla fiziksel, kimyasal ve genellikle bakteriyolojik olarak tanımlanan bir durumdur. Klinik mastitis erken laktasyon sırasında süt ineklerinin üreme performansını belirgin şekilde etkileyen, yoğun inflamasyon belirtilerinin (şişme, sıcaklık, kızarıklık ve ağrı) varlığı ile karakterizedir. Klinik mastitisler belirtilerine göre perakut, akut ve subakut mastitis şeklinde sınıflandırılır (Yang vd., 2012; Hamadani vd., 2013). Süt inekleri ve mandalarda klinik mastitise

neden olan etkenler genellikle *S. aureus*, KNS türleri, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *T. pyogenes*, *Mycoplasma* spp., *E. coli* ve mikotik mastitis ajanları olarak ise özellikle *Candida* spp. önemli bir yer tutmaktadır (Sharma vd., 2018; Ali vd., 2021; Kurt ve Ekşi, 2021; Hassan vd., 2023; Tuzcu vd., 2023).

Perakut mastitisler, genellikle *Staphylococcus* türlerinin neden olduğu, şiddetli seyreden, lokal değişimlerin hızla ortaya çıktığı genel semptomlarla karakterizedir (Şahin ve Yıldırım, 2015). Akut klinik mastitisler, aniden başlar ve genellikle memede şişlik, ağrı, ateş, hayvanda iştahsızlık, dehidrasyon, süt üretiminde belirgin azalma ve sütte belirgin değişiklikler gibi sistemik etkilerle birlikte görülürler. Subakut mastitisler ise, memedeki ve sütteki klinik bulguların belirgin olmaması ile karakterizedir (Fagiolo ve Lai, 2007).

1.10.2.2 Subklinik Mastitis

Subklinik mastitis diğer klinik formlara göre daha yaygın olarak görülürken, genellikle normal meme görünümü ve süt ile karakterizedir. Subklinik mastitis, belirgin bir yangı veya süt bileşiminde anormal belirti olmadan ortaya çıkan değişikliklere sahiptir. Ancak sütte somatik hücre sayısında (SHS) artış meydana gelir. Subklinik mastitiste SHS'deki değişiklikler California Mastitis Test (CMT) ve elektriksel iletkenlik tarama testi ya da değişiklikleri daha net veren özel ticari cihaz sistemleri kullanılarak tespit edilebilir (Fagiolo ve Lai, 2007). Subklinik mastitis genellikle düşük süt üretimi, süt yapısında değişiklikler, süt işleme veriminde azalma, düşük protein düzeyleri ve patojenik mikroorganizma varlığı gibi faktörler nedeniyle süt kalitesi ve süt hijyeni açısından da yüksek risk taşımaktadır (Sharma vd., 2011). İnek ve mandalarda subklinik mastitise neden olan dominant mikroorganizmalar arasında *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türleri önemli yer tutmaktadır. Subklinik mastitise neden olan *Candida* türleri arasında ise, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* ve *C. guilliermondii* daha sık rapor edilmektedir (Zaragoza vd., 2011; Dworecka-Kaszak vd., 2012; Du vd., 2018; Kaczorek-Łukowska vd., 2021; Kurt ve Ekşi, 2021; Khasapane vd., 2023).

1.11. Mayalara Bağlı Mastitisler

Ruminant mastitislerinin etiyolojisinde genellikle bakteriler ana patojenler olarak kabul edilmekte (Cobirka vd., 2020; Ali vd., 2021), meme dokusunun fırsatçı patojenleri olduğu düşünülen mayalar ise sekonder mastitis patojenleri olarak değerlendirilmektedir (Zaragoza vd., 2011; Akdouche vd., 2014; Eldesouky vd., 2016; Bertolini vd., 2022). Özellikle etkene spesifik olmayan antibakteriyel ilaçların uzun süreli ve hatalı kullanımı, kontaminasyona neden olan meme tedavisi uygulamaları, uygun ortam sıcaklığı, yüksek nem, mevsimsel etkiler ve hayvanların kirli sulara girmesi gibi faktörlerin memede maya kolonizasyonuna neden olabileceği bildirilmektedir (Zaragoza vd., 2011; Akdouche vd., 2014; Cheng ve Han, 2020; Bari vd., 2022). Ancak, son yıllarda mastitis etiyolojisine yönelik yapılan araştırmalarda mikotik mastitis ajanlarının izolasyonunun giderek yaygınlaşması bu etkenlere bakış açısını değiştirmiştir (Eldesouky vd., 2016; Du vd., 2018; Cilvez ve Turkyilmaz, 2019; Hizlisoy vd., 2020; Yüksel Dolgun vd., 2022; Awandkar vd., 2023). İnek ve mandalarda mikotik mastitislerden *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. ve *Torulopsis* spp. gibi farklı mantar türleri izole edilmiştir (Zaragoza vd., 2011; Mohamed vd., 2022). Bu etiyolojik ajanlar içerisinde inek ve mandalarda subklinik ve klinik mastitis etkeni olarak en yaygın rapor edilen türler *Candida* cinsi üyeleri içerisinde yer alan *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* ve *C. guilliermondii*'dir (Sartori vd., 2014; Ksouri vd., 2015; Erbaş vd., 2017; Du vd., 2018; Sav ve Öztürk, 2022). Özellikle *C. glabrata* ve *C. krusei*, mikotik mastitiste önemli etkenler olarak kabul edilmektedir (Toxqui-Munguia vd., 2022; Yüksel Dolgun vd., 2022).

1.12. California Mastitis Test (CMT)

Mastitisin sahadaki teşhisi genellikle, sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerinde oluşan değişikliklerin en fazla sütteki SHS'yi etkilemesi nedeniyle sütte SHS belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Sharma vd., 2011; Alhussien ve Dang, 2018). Bu amaçla da, en yaygın olarak kullanılan test California Mastitis Test (CMT) olmak üzere, White Side Test (WST), Wisconsin Mastitis Test (WMT) ve katalaz testleri de kullanılmaktadır

(Yağcı, 2008; Adkins ve Middleton, 2018; Jesse vd., 2023). CMT; gelişmiş teknolojik ekipmanlara gerek duyulmayan basitçe uygulanabilen, kullanışlı, hızlı sonuç veren ve ekonomik bir test olması nedeniyle sahada sıklıkla tercih edilmektedir. Genellikle subklinik mastitislerin teşhisi amacıyla kullanılan bu test, sütteki SHS miktarına yönelik kabaca sayısal bir değer vermekle birlikte, SHS'nin yüksek veya düşük olduğuna dair tahmini bir fikir verebilmektedir (Moroni vd., 2018). Sağlıklı kabul edilen meme lobu düzeyinde sütlerde SHS'nin ml'de 100 000'in altında olması istenir. Somatik hücre sayısı ml'de 150 000-500 000 arası olan sütler CMT şüpheli, 400 000-1 500 000 arası olan sütler CMT (+), 800 000-5 000 000 arası olan sütler CMT (++) ve 5 000 000'dan fazla olan sütler CMT (+++) olarak derecelendirilmektedir (Schalm vd.,1971; Rişvanlı ve Kalkan, 2002). Subklinik mastitislerin tespit edilmesinde başta CMT olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılsa da, mikrobiyolojik teşhis "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Özenç vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, Afyonkarahisar'da mastitisli Anadolu mandaları ve süt ineklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu, moleküler tiplendirilmesi, *C. albicans* olarak identifiye edilen izolatlarda aglutinin benzeri sekans (*ALS1*), salgısal aspartil proteinaz (*SAP1*) ve fosfolipaz enzimi (*PLB1*) virülens genlerinin varlığının araştırılması ve *Candida* izolatlarının antifungal duyarlılık/dirençlilik profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hayvanların Seçimi ve Süt Örnekleri

Bu Tez, Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde yer alan aile tipi ve ticari tipte işletmelerden seçilen farklı laktasyon dönemlerinde en az bir doğum yapmış, son bir ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamış toplam 39 manda işletmesinde bulunan 301 sağmal Anadolu mandası ve 14 süt sığırı işletmesinde bulunan 332 sağmal inek üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada 301 sağmal mandaya ait 1188 meme lobu süt örneği ve 332 sağmal ineğe ait 1321 meme lobu süt örneği olmak üzere, toplam 2439 meme lobu süt örneği materyal olarak kullanıldı. Örneklenen mandalarda 16 meme lobu, süt ineklerinde ise yedi meme lobu kördü. Klinik mastitisli hayvanlar örneklemede kullanılmadı. Örneklenen hayvanların örneklemenin yapıldığı yerlere göre dağılımı Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1: Örneklenen hayvanların örneklemenin yapıldığı yerlere göre dağılımı

Örnekleme Yapılan Yerler	Örneklenen Hayvan Sayısı (n)	
	Anadolu Mandası	İnek
Emirdağ	-	27
İhsaniye	-	9
Sinanpaşa	3	34
Kılıçarslan Beldesi	-	39
Bolvadin	61	68
Çay	118	29
Merkez	52	-
Merkez/İsmail Köyü	9	46
Merkez/Akçin Köyü	24	58
Merkez/Erkmen	2	-
Merkez/Küçük Çobanlar	32	22
Toplam	301	332

Çalışmaya dahil edilen hayvanların öncelikle meme loblarının fiziksel muayenesi yapılarak meme loblarında şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık, sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi anormallikler değerlendirildi ve kayıt altına alındı. Daha sonra ise her bir meme lobuna CMT uygulanarak Schalm vd. (1971) tarafından önerildiği şekilde test skorları +1, +2, +3, şüpheli ve negatif olarak kaydedildi. CMT skorlaması sonucunda, en az bir meme lobunda CMT pozitif reaksiyon alınan hayvanlar mastitis yönünden infekte olarak değerlendirilerek bu hayvanların meme loblarından aseptik koşullarda süt örnekleri alındı. Her bir meme başı kaba kirlerden arındırıldıktan sonra %70'lik alkol ile temizlendi ve birkaç sağımla işlemi ile süt kanalındaki ilk süt uzaklaştırıldı. Daha sonra her meme lobundan 10 ml süt örneği steril tüplere alınarak soğuk zincirde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

2.1.2. Standart Suşlar

Tüm test ve uygulamalarda *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.3.1. Sabouraud %2 Dekstroz Broth (SDB, Merck Millipore, 108339.0500, Almanya)

Sabouraud Dekstroz Broth 30 g tartılarak 1000 ml distile suda pH aralığı 5,4-5,8 olacak şekilde çözdürüldü. Cam tüplere 9'ar ml olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtıldı. Sterilizasyon için 121 °C'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı.

Çizelge 2.2: Sabouraud Dekstroz Broth içeriği

Pepton (Kazein)	5 g/L
Pepton (Et)	5 g/L
D(+)-Glukoz (=Dekstroz)	20 g/L

2.1.3.2. Sabouraud %4 Dekstroz Agar (SDA, Merck Millipore, 105438.0500, Almanya)

Besiyeri 65 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $5,6\pm0,2$ olacak şekilde tamamen çözündürüldü. Sterilizasyon için $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı. Besiyeri $45\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulduktan sonra, üretici firmanın önerisi doğrultusunda 500 ml besiyerine 5 ml olacak şekilde kloramfenikol supplementi eklendi. Besiyeri steril petri kutularına 15'er ml olacak şekilde döküldü.

Çizelge 2.3: Sabouraud Dekstroz Agar içeriği

Pepton (Kazein)	5 g/L
Pepton (Et)	5 g/L
D(+)-Glukoz (=Dekstroz)	40 g/L
Agar-agar	15 g/L

Çizelge 2.4: Supplement içeriği

Kloramfenikol	50.0 mg
---------------	---------

2.1.3.3. *Candida* Chromogenic Agar (CCA, Condalab, 1382, İspanya)

CCA besiyeri 45,9 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $6,1\pm0,2$ olacak şekilde tamamen çözündürüldü. Besiyeri $45\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kutularına 15'er ml olacak şekilde döküldü.

Çizelge 2.5: *Candida* Chromogenic Agar içeriği

Glukoz	20 g/L
Bakteriyolojik Agar	15 g/L
Pepton	10 g/L
Kloramfenikol	0,5 g/L
Kromojenik Karışım	0,4 g/L

2.1.3.4. Tween 80 İlaveli Corn Meal Agar (CMA, BD, 211132, ABD)

Corn Meal Agar (mısır unlu agar) besiyeri 17 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $6,0 \pm 0,2$ olacak şekilde tamamen çözündürüldü. İçerisine üretici firmanın önerisi doğrultusunda %1 oranında Tween 80 (Merck, 822187, Almanya) eklendi. Sterilizasyon için $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı. Besiyeri $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kutularına 15'er ml olacak şekilde döküldü.

Çizelge 2.6: Corn Meal Agar içeriği

Mısır Unu İnfüzyonu (Katı)	2,0 g
Agar	15,0 g
Tween 80	%1

2.1.3.5. Tryptic Soy Agar (TSA, Condolab, 1068, İspanya)

TSA besiyeri 40 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $7,3 \pm 0,2$ olacak şekilde tamamen çözündürüldü. Sterilizasyon için $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı. Besiyeri $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kutularına 15'er ml olacak şekilde döküldü.

Çizelge 2.7: Tryptic Soy Agar içeriği

Bakteriyolojik Agar	15 g/L
Sodyum Klorür	5 g/L
Tripton (Kazein)	15 g/L
Pepton (Soya)	5 g/L

2.1.3.6. Mueller Hinton Agar (MHA, Condalab, 1055, İspanya)

MHA besiyeri 38 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $7,4 \pm 0,2$ olacak şekilde tamamen çözündürüldü. Sterilizasyon için $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı. Besiyeri $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra, içerisine glukoz (litrede %2 olacak şekilde) ve metilen mavisi (litrede 0,5 mg olacak şekilde) ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril petri kutularına 15'er ml olacak şekilde döküldü.

Çizelge 2.8: Mueller Hinton Agar içeriği

Asit Kazein Pepton	17,5 g/L
Bakteriyolojik Agar	17 g/L
Sığır Eti İnfüzyonu	2 g/L
Nişasta	1,5 g/L

2.1.3.7. Tryptic Soy Broth (TSB, Merck Millipore, 105459.0500, Almanya)

TSB besiyeri 30 g tartıldı ve 1000 ml distile su içerisinde ısıtılarak pH'sı $7,3 \pm 0,2$ olacak şekilde tamamen çözdürüldü. Sıvı besiyerine %15 oranında gliserin eklendi. Ependorf tüplerine 1,5 ml olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtıldı. Sterilizasyon için $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklav işlemi uygulandı.

Çizelge 2.9: Tryptic Soy Broth içeriği

Pepton (Kazein)	17 g/L
Pepton (Soya Unu)	3 g/L
D(+)-Glukoz Monohidrat	2,5 g/L
NaCl	5 g/L
Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)	2,5 g/L

2.1.4. Boyalar

Ticari olarak temin edilen 5x500 ml'lik Gram boyama seti (Merck, 111885, Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.10: Gram boyama seti içeriği

Kristal Viyolet	500 ml
Lugol	500 ml
Dekolorizasyon Çözeltisi (%95'lik Alkol)	500 ml
Safranin	500 ml

2.1.5. Tavşan plazması (Merck Millipore, M113306.0001, Almanya)

Dondurularak kurutulmuş EDTA-tavşan plazması 3 ml steril distile su içinde çözdürüldü. Sulandırılmış tavşan plazmasından 0,5 ml steril tüpe alınarak şüpheli koloni ile homojenize edildi. Homojenize süspansiyon 37 °C’de 3 saatlik inkübasyona kaldırıldı.

2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

2.1.6.1. Primerler (Sentebiolab, Türkiye)

Candida şüpheli izolatların cins bazında tanımlanmasında 5.8S rDNA’nın korunmuş bölgelerini içine alan ve üniversal olarak kullanılan *ITS* primerlerine alternatif olarak yine 5.8S rDNA *ITS* gen bölgesini hedef alan yeni primerler tasarlandı ve ticari olarak sentezletildi (Çizelge 2.11). Virülens genlerinin tespiti için ise aşağıda verilen primer dizileri sentezletildi ve kullanıldı. Primerler, kullanım aşamasında üretici firmanın önerisi doğrultusunda sulandırılarak kullanıldı.

Çizelge 2.11: *ITS* bölgesi ve virülens genlerini hedef alan primer dizileri

Primer	Oligonükleotid sekansları (5'-3')	Ürün uzunluğu (base pair, bp)	Kaynak
<i>ITS</i>	F:CAA-CGG-ATC-TCT-WGG-TTC-TCG-CA R:TGC-TTA-AGT-TCA-GCG-GGT-AKT-CC	300-400	Bu çalışmada tasarlandı.
<i>ALS1</i>	F:GAC-TAG-TGA-ACC-AAC-AAA-TAC-CAG-A R:CCA-GAA-GAA-ACA-GCA-GGT-GA	318	(Inci vd., 2013)
<i>SAP1</i>	F:TGA-GGC-TGC-TGG-TGA-TTA-TG R:TGC-CAA-CAG-CTT-TGA-GAG-AA	224	(Correia vd., 2010)
<i>PLB1</i>	F:ATG-ATT-TTG-CAT-CAT-TTG R:AGT-ATC-TGG-AGC-TCT-ACC	751	(Mukherjee vd., 2001)

2.1.6.2. Tris-HCl/Borik Asit/EDTA (TBE) Buffer (SNP, Türkiye)

10X TBE solüsyonu, agaroz jel hazırlamada ve elektroforez tankında kullanılacak olan 0,5X TBE solüsyonu hazırlanmasında kullanıldı. 10X TBE solüsyonundan 0,5X TBE solüsyonu aşağıdaki tabloda gösterilen oranlar kullanılarak hazırlandı.

Çizelge 2.12: 10X TBE solüsyonu içeriği

Tris-Hcl	89 mM	54 gr
Borik Asit	89 mM	27,5 gr
Edta	2 mM	50 ml
pH	8.0	

Çizelge 2.13: 0,5X TBE kullanma solüsyonu içeriği

TBE 10X	50 ml
Distile su	950 ml

2.1.6.3. Agaroz Jel

Jel elektroforez işlemi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 2 g tartılan agaroz (GeneOn, Almanya) üzerine 100 ml 0,5X TBE eklenerek mikrodalga fırında 3-5 dakika kaynatıldı. Berrak ve homojenize hale gelen karışım 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Agaroz jelin boyanması için 5µl/ml Ethidium Bromid (SNP, Türkiye) eklendi. Jel kabı içerisine taraklar yerleştirildi. Agaroz jel sıvı halde kabarcık oluşturmayacak şekilde jel kabına döküldü. Oda ısısında donması beklenen jel, donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi.

Çizelge 2.14: Agaroz jel içeriği

Agaroz (GeneOn, Almanya)	2 gr
TBE (0,5X)	100 ml

2.1.6.4. Gel Loading Dye (6X) (SNP, Türkiye)

PZR işlemi sonrası ampliconların jeldeki kuyucuklara yüklenmesinde 5 µl 6x loading dye blue (yükleme boyası) ve 25 µl DNA örneğinden oluşan karışım kullanıldı.

2.1.7. Marker

Agaroz Jel Elektroforezi sırasında DNA bantlarının büyüklüklerini izlemek için 100 bp Plus DNA Marker (GeneOn, Almanya) kullanıldı.

2.1.8. Cihazlar

Ekstraksiyon sonrası DNA saflık kontrolü NanoDrop 8000 spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile yapıldı. PZR işlemleri; 96 kuyucuklu Eppendorf Mastercycler Ep Gradient S (Almanya) ve 16 kuyucuklu BioCycler TC-S (Almanya) marka termal döngüleme cihazlarında gerçekleştirildi. Elektroforez işlemleri için EC 4000P, Power Supply (Thermo, ABD) güç kaynağı ve Thermo EC Midicell Primo EC-330 (ABD) yatay elektroforez tankı kullanıldı. Jel görüntüleme işlemi için UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, Avustralya) ve Vilber Lourmat Biovision (Vilber Lourmat, Fransa) marka görüntüleme cihazları kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. *Candida* Türlerinin İzolasyonu

2.2.1.1. Örneklerden SDB ve SDA Besiyerlerine Ekim ve Gram Boyama

Soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan her bir meme lobu süt örneği önce ön zenginleştirme için SDB'ye geçildi. Bu amaçla, tüplerde 9 ml olarak hazırlanan SDB'ler içerisine 1 ml süt örnekleri eklendi ve besiyerleri 30 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi (Silveira-Gomes vd., 2011). İnkübasyon sonrasında brothlar vorteks ile karıştırıldıktan sonra, her birinden bir öze dolusu alınarak %1 oranında kloramfenikol supplementi ilave edilmiş SDA besiyerlerine ekimler yapıldı. Ekim yapılmış petriler, aerobik koşullarda, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda SDA'da yumuşak, düzgün kenarlı, nemli, krem-beyaz renkli, oval koloni morfolojisine sahip izolatlar *Candida* türleri yönünden şüpheli olarak değerlendirildi. Ardından şüpheli izolatlara Gram boyama uygulandı (Arda, 2015).

2.2.1.2. *Candida* Kromejenik Agara Ekim

Gram boyama sonrasında Gram pozitif, oval ve silindirik mikroskopik morfolojiye sahip şüpheli izolatların *Candida* kromojenik agara pasajları yapıldı ve petriler 37 °C'de aerobik koşullarda 24-72 saat süreyle inkübe edildi. Besiyerinde soluk yeşil renkli ve düzgün koloniler *C. albicans*, yeşil-mavi renkli ve mat koloniler *C. tropicalis*, pembe renkli koloniler ise *C. krusei* şüpheli olarak değerlendirildi (Odds ve Bernaerts, 1994). *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750 ve *C. krusei* ATCC 6258 suşları pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

2.2.1.3. Germ Tüp Testi ve Klamidospor Oluşumu

C. albicans'ın fenotipik olarak tür düzeyinde tanımlanmasında germ tüp oluşturabilme yeteneği ve klamidospor oluşumu dikkate alındı. Germ tüp oluşturabilme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla, Gram boyama sonrasında *Candida* şüpheli olarak kabul edilen

izolatlarla ait kolonilerden öze yardımı ile bir miktar alındı. Koloniler içerisinde 0,5 ml tavşan plazması bulunan steril tüpte karıştırılarak süspanse edildi. Süspansiyonlar, 37 °C’de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra süspansiyondan alınan bir damladan lam-lamel arası preparat hazırlanıp preparat ışık mikroskopunda incelendi. Işık mikroskopunda 40x objektifte inceleme sonucunda, blastospordan boğum yapmadan uzayan boru şeklinde yapıların varlığı germ tüp pozitif olarak değerlendirildi (Shepherd vd., 1980). Testlerde *C. albicans* ATCC 10231 suşu pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

Klamidospor oluşumu için ise Tween 80 ilaveli mısır unlu besiyeri kullanıldı. *Candida* şüpheli izolatlardan besiyerine ekim yapıldı ve petriler 26 °C’de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda petriler ışık mikroskopunda, diyafram kapalı olarak 40x büyütmede incelendi. Psödohifaların uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidosporlar ile hifa birleşim yerlerinde blastospor kümelerinin görülmesi *C. albicans* pozitif olarak değerlendirildi (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000). Testlerde *C. albicans* ATCC 10231 suşu pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

Fenotipik olarak izolasyonu gerçekleştirilen tüm izolatlar, daha sonradan DNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere %15 oranında gliserin içeren Trypticase soy Broth (TSB) içerisinde -20 °C’de saklandı.

2.2.2. Moleküler İdentifikasyon

2.2.2.1. *Candida* İzolatlarının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Cins Düzeyinde İdentifikasyonu

2.2.2.1.1. DNA Ekstraksiyonu

Candida şüpheli tüm izolatlar ve pozitif kontrol suşlarından DNA ekstraksiyonu yapılması amacıyla ticari olarak satın alınan NucleoSpin Microbial DNA ekstraksiyon kitleri (MN, Almanya) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu, kit üreticisi firmanın talimatlarına uyularak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

TSB içerisinde -20 °C’de saklanmakta olan izolatlar ve pozitif kontrol suşları SDA'ya pasajlandı. Bir gecelik kültürden alınan 3-5 koloni, içerisinde 1 ml steril distile su bulunan ependorflarda karıştırıldı. Ependorflar 12 000 rpm’de üç dakika santrifüj yapılarak süpernatant sıvı uzaklaştırıldı. Ependorf tüpteki örneğin üzerine ayırma tamponu (elution buffer) ilave edilerek süspansiyon boncuklu Tip B tüplere (MN bead tubes type B) transfer edildi. Tüpün üzerine lizis solüsyonu (lysis buffer) ve likit proteinaz K enzimi ilave edildi. Süspansiyon çalkalayıcıda 12 dakika karıştırıldıktan sonra maya örnekleri için önerilen 11 000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Hücre çeperi parçalanan süspansiyonun üzerine DNA bağlanması için tampon solüsyon (buffer) ilave edilerek tekrar 11 000 g’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Daha sonra süspansiyon DNA toplama tüpü içerisindeki nükleospin mikrobiyal DNA kolonuna transfer edildi. Süspansiyon 11 000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon yeni bir tüpe alındı ve tampon solüsyonlar (bufferlar) yardımıyla silika membran yıkamaları yapıldı. DNA elde edilmesi için son aşamada, nucleospin mikrobiyal DNA kolonu 1,5 ml nükleaz içermeyen bir tüpe alındı. Üzerine tekrar ayırma tamponu (elution buffer) eklendi. Tüp oda ısısında bir dakika inkübe edildikten sonra 30 saniye santrifüj edildi ve DNA ekstraksiyonu tamamlandı.

2.2.2.1.2. Ekstrakte Edilen DNA’ların Miktar ve Saflık Kontrolü

Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA’ların miktar tayini NanoDrop 8000 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. DNA miktarı 1,8 ile 2 ng/μl arası olan değerler PZR ürünleri için uygun olarak kabul edildi (Hernday vd., 2010). Ekstrakte edilen DNA’ların bütünlük ve saflık kontrolleri %1’lik agaroz jel elektroforezde gerçekleştirildi. Bu aşama için 5 μl DNA ve 1 μl yükleme solüsyonu kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi 100 V’da 45 dakika uygulandı. Başlangıç noktasına yakın bir hatta yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlemlenmesi, ekstrakte edilen DNA'ların saf ve bütünlüğünün tam olduğunu gösterdi (Sambrook vd., 1989) (Fotoğraf 2.1).



Fotoğraf 2.1: DNA saflık kontrolü için jel elektroforez görüntüsü

2.2.2.1.3. Amplifikasyon Koşulları

DNA'ları ekstrakte edilen *Candida* şüpheli izolatların cins düzeyinde identifikasyonunda kullanılan *ITS* genine ait cins spesifik primerler ve beklenen bant büyüklüğü Çizelge 2.15'de verilmiştir.

Çizelge 2.15: *ITS* bölgesini hedef alan primer dizileri ve bant uzunluğu

Primer	Oligonükleotid sekansları (5'-3')	Ürün uzunluğu (base pair, bp)	Kaynak
<i>ITS</i>	F:CAA-CGG-ATC-TCT-WGG-TTC-TCG-CA	300-400	Bu çalışmada tasarlandı.
	R:TGC-TTA-AGT-TCA-GCG-GGT-AKT-CC		

PZR, her bir örnek için toplam 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon master miksi; 10x PCR buffer, 25 mM MgCl₂ (son konsantrasyon 2 mM), 10 µM dNTP miksi (son konsantrasyon 0,2 mM), 10 pmol primerlerden 0,2 mM, 5U Taq DNA polimeraz (son konsantrasyon 1U), 5 µl hedef DNA ve steril distile sudan oluştu (Çizelge 2.16).

Amplifikasyonda kullanılacak en uygun sıcaklıkların belirlemesi amacıyla ilk olarak Gradient PZR yapıldı. Ardından, konvansiyonel PZR için Çizelge 2.17'de verilen amplifikasyon protokolü oluşturularak kullanıldı. Elde edilen amplifikasyon ürünlerine Ethidium Bromid (5 µl/ml) ile hazırlanmış %2'lik agaroz jelde sabit akımda 100 Voltta 45 dakika elektroforez işlemi uygulandı. Amplikonlar (300-400 bp) UV-transilluminatörde görüntülendi.

Çizelge 2.16: PZR işleminde kullanılan bileşenler ve miktarlar

Bileşenler	Miktar
10X PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP Karışımı	1 µl
ITS-Primer F	1 µl
ITS-Primer R	1 µl
Taq DNA Polimeraz (1U)	0,25 µl
DNA	5 µl
Steril Distile Su	32,75 µl

Çizelge 2.17: PZR işleminde kullanılan amplifikasyon koşulları

Aşama	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	1	94 °C	3 dk
Denatürasyon		94 °C	30 sn
Primer Bağlanma	40	55 °C	30 sn
Uzama		72 °C	1 dk
Son Uzama	1	72 °C	10 dk

2.2.2.2. *Candida* İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu

2.2.2.2.1. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz

Konvansiyonel PZR ile *Candida* olarak doğrulanan izolatların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla, ampliconlar ve bu çalışmada tasarlanan ITS primerlerinden 20'şer µl sekans analizi için özel bir firmaya (Microsynth, İsviçre) gönderildi. Firma tarafından saflaştırmayı takiben ampliconlara tek yön Sanger Sekans analizi uygulandı. Her bir örnek için firma tarafından gönderilen nükleotid dizi analizlerinden tür tayini belirlenmesinde BLAST programı kullanıldı. En yüksek homoloji oranına (>%96) sahip sekans türü ile örnek türü aynı kabul edildi.

Sekans analizi sonrası filogenetik yakınlığın belirlenmesi amacıyla evrimsel geçmiş, aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (Unweighted pair group

method with arithmetic mean, UPGMA) kullanılarak çıkarıldı (Sneath ve Sokal, 1973). Evrimsel ilişkiler maksimum olabilirlik (maksimum likelihood) yöntemi (Tamura vd., 2004) kullanılarak hesaplandı. *Candida* türleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla filogenetik ağaç oluşturulması ve evrimsel analizler MEGA11 programında gerçekleştirildi (Tamura vd., 2021).

2.2.2.3. *C. albicans*'ın Virülens Genlerinin Araştırılması

Tek yön Sanger Sekans analizi ile *C. albicans* olarak identifiye edilen izolatlarda; adhezyon faktörü (*ALS1*), proteaz enzimi (*SAP1*) ve fosfolipaz enzimi (*PLB1*) genlerinin varlığı tekli PZR kullanılarak araştırıldı. Virülens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları ve beklenen baz büyükleri Çizelge 2.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.18: Virülens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları ve beklenen baz büyükleri

Primer	Oligonükleotid sekansları (5'–3')	Ürün uzunluğu (base pair, bp)	Kaynak
<i>ALS1</i>	F:GAC-TAG-TGA-ACC-AAC-AAA-TAC-CAG-A R:CCA-GAA-GAA-ACA-GCA-GGT-GA	318	(Inci vd., 2013)
<i>SAP1</i>	F:TGA-GGC-TGC-TGG-TGA-TTA-TG R:TGC-CAA-CAG-CTT-TGA-GAG-AA	224	(Correia vd., 2010)
<i>PLB1</i>	F:ATG-ATT-TTG-CAT-CAT-TTG R:AGT-ATC-TGG-AGC-TCT-ACC	751	(Mukherjee vd., 2001)

Her bir örnek için final hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlanan PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları Çizelge 2.19'da, virülens genleri için kullanılan amplifikasyon protokolü Çizelge 2.20'de sunulmuştur.

Çizelge 2.19: PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (*ALS1*, *SAP1*, *PLB1*)

Bileşenler	Miktar
10X PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
dNTP Karışımı	1 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Taq DNA Polimeraz (1U)	0,25 µl
DNA	5 µl
Steril Distile Su	32,75 µl

Çizelge 2.20: PZR işleminde kullanılan amplifikasyon koşulları (*ALS1*, *SAP1*, *PLB1*)

Basamak	Döngü Sayısı			Sıcaklık			Süre		
	<i>ALS1</i>	<i>SAP1</i>	<i>PLB1</i>	<i>ALS1</i>	<i>SAP1</i>	<i>PLB1</i>	<i>ALS1</i>	<i>SAP1</i>	<i>PLB1</i>
Ön Denatürasyon	1	1	1	94 °C	94 °C	94 °C	5 dk	5 dk	5 dk
Denatürasyon				94 °C	94 °C	94 °C	30 dk	30 dk	30 dk
Primer Bağlanma	35	30	35	48 °C	54 °C	50 °C	30 dk	30 dk	30 dk
Uzama				72 °C	72 °C	72 °C	1 dk	1 dk	1 dk
Son Uzama	1	1	1	72 °C	72 °C	72 °C	10 dk	10 dk	10 dk

2.2.3. Antifungal Duyarlılık Testi

Genotipik olarak identifiye edilen *Candida* türlerinin antifungal ajanlara duyarlılıklarının tespitinde Mueller Hinton agarda gerçekleştirilen Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Kullanılan yöntem, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) dökümanına uygun olarak gerçekleştirildi. Besiyerine %2 oranında glukoz ve 0,5 mg/l metilen mavisi eklendi. Bir gecelik kültürden elde edilen taze koloniler, McFarland No:5 yoğunluğunda ayarlanarak sulandırıldı. Sulandırılan izolatlar steril pamuklu svab yardımıyla glukoz ve metilen mavisi ilave edilmiş Mueller Hinton agar yüzeyine yayıldı. Mueller Hinton agar

yüzeyindeki fazla neminin emilmesi için 3-5 dakika beklendi. Antifungal diskler steril pens yardımıyla eşit aralıklı şekilde petri kabına yerleştirildi. Diskler agar yüzeyiyle temasını sağlamak için hafifçe bastırıldı. Antifungal test için hazırlanan petriler ters çevrilerek 35 °C (± 2 °C) 20-24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden ölçüldü (CLSI, 2022).

Antifungal duyarlılığın belirlenmesinde; hücre duvarına, hücre membranına ve nükleik asit sentezine etki eden antifungal ilaçlar tercih edildi. Bu amaçla, kaspofungin (5 µg), amfoterisin B (20 µg), ketokonazol (10 µg), flukonazol (10 µg), itrakonazol (10 µg), vorikonazol (1 µg) ve flusitozin (1 µg) diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. Zon çaplarının değerlendirilmesi CLSI standartlarına göre yapıldı (CLSI, 2022).

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Bu Tez çalışmasında, Afyonkarahisar ili'nde ve ilçelerinde bulunan 39 farklı işletmeden örneklenen 301 Anadolu mandasına ait toplam 1188 meme lobu süt örneği kullanıldı. Klinik mastitisli hayvanlar örneklemede kullanılmadı. Her bir meme lobuna uygulanan CMT sonuçlarına göre, CMT pozitif 394, CMT şüpheli 550 ve CMT negatif 244 meme lobu belirlendi. CMT'ye pozitif, şüpheli ve negatif reaksiyon veren toplam 1188 meme lobundan SDA'da 93 (%7,82) *Candida* şüpheli izolat elde edildi. İzolatların CMT skorlarına göre dağılımları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çalışmada ayrıca, Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde bulunan 14 farklı işletmedeki 332 sağmal ineğe ait toplam 1321 meme lobu süt örneği incelendi. Süt ineklerinin klinik mastitis tespit edilenleri örneklemeye dahil edilmedi. Meme loblarına yapılan CMT sonuçlarına göre; 396 meme lobu CMT pozitif, 392 meme lobu CMT şüpheli ve 533 meme lobu CMT negatif olarak belirlendi. CMT'ye pozitif, şüpheli ve negatif reaksiyon veren toplam 1321 meme lobundan SDA'da 99 (%7,49) *Candida* şüpheli izolat elde edildi. İzolatların CMT skorlarına göre dağılımları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

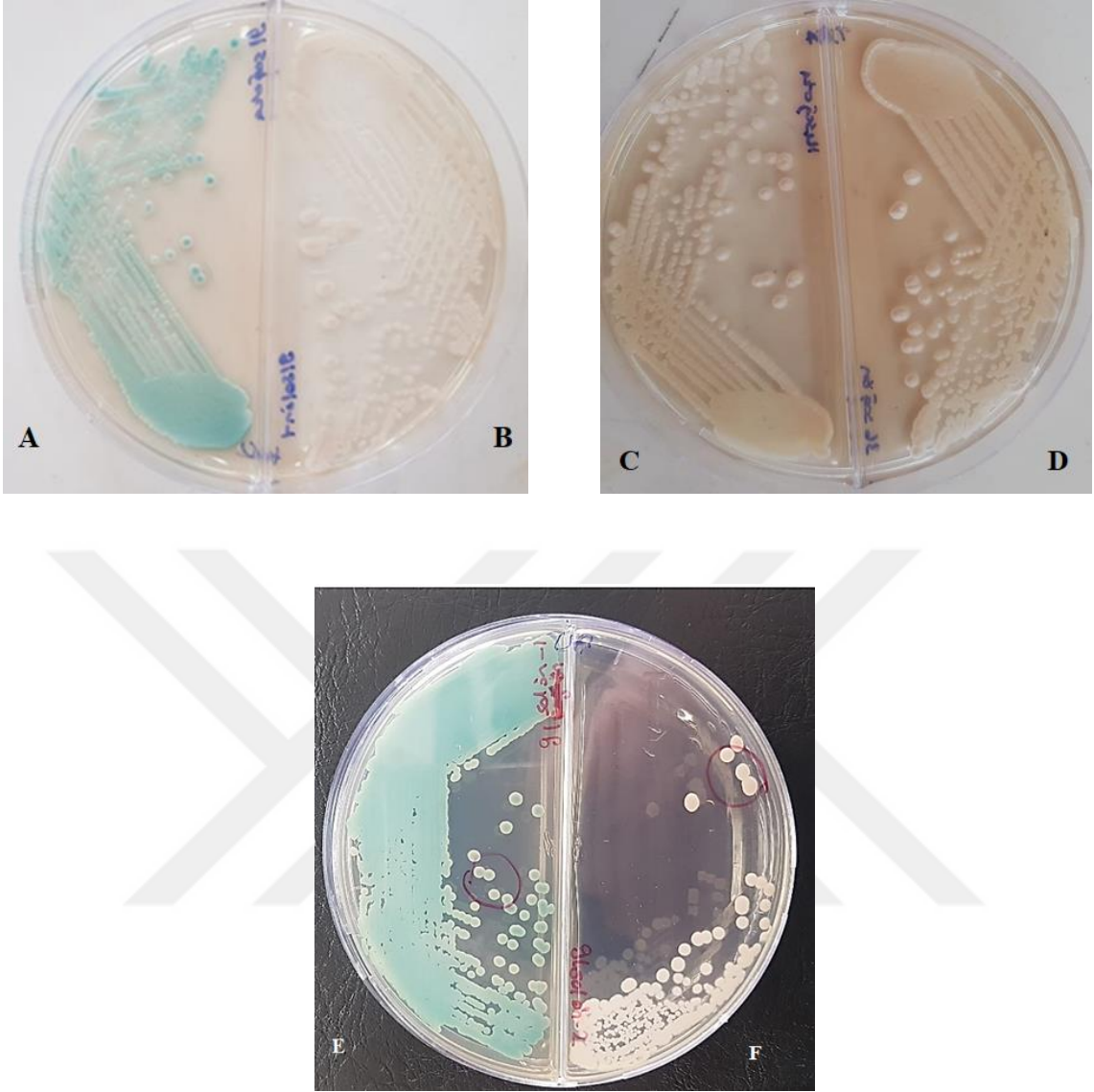
Çizelge 3.1: Anadolu Mandalarından izole edilen *Candida* izolatlarının CMT skorlamasına göre dağılımı

CMT Skorlaması (meme lobu düzeyinde)	İzolat Sayısı (n)	Yüzde (%)
CMT +3 (49)	2	4,08
CMT +2 (195)	8	4,1
CMT +1 (150)	5	3,33
CMT Şüpheli (550)	30	5,45
CMT Negatif (244)	48	19,7

Çizelge 3.2: Süt ineklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının CMT skorlamasına göre dağılımı

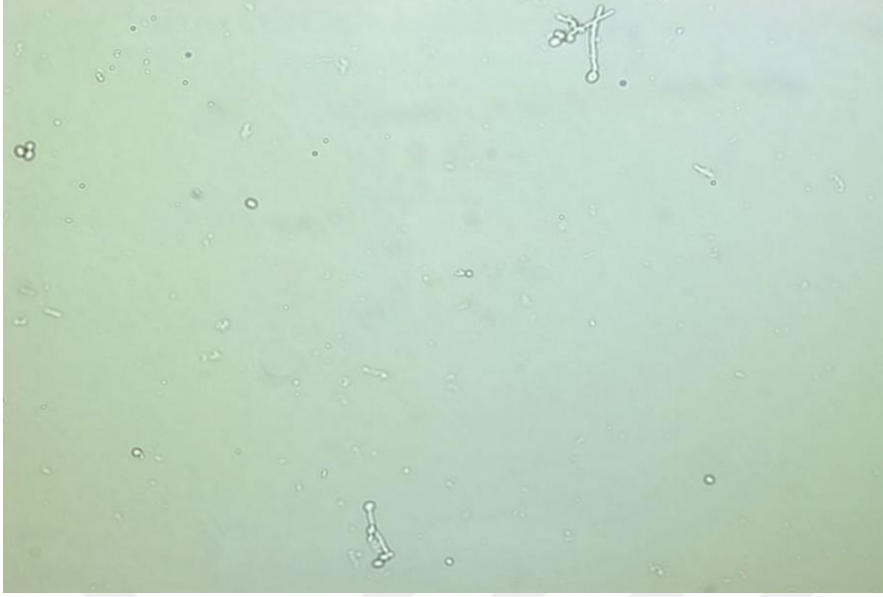
CMT Skorlaması (meme lobu düzeyinde)	İzolat Sayısı (n)	Yüzde (%)
CMT +3 (0)	-	-
CMT +2 (189)	4	2,11
CMT +1 (207)	38	18,35
CMT Şüpheli (392)	42	10,71
CMT Negatif (533)	15	2,81

Çalışmada *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*'yi tanımlamakta kullanılan CCA'da üreme sonuçları da değerlendirildi. Buna göre; Anadolu mandalarından izole edilen 93 *Candida* şüpheli izolatın ikisi soluk yeşil renkli ve düzgün koloniler (*C. albicans* şüpheli), 74'ü pembe renkli, dördü açık pembe renkli koloniler (*C. krusei* şüpheli), biri beyazımsı renkte koloni (*C. glabrata* şüpheli) ve 12'si krem/beyaz renkli koloniler oluşturdu. Süt ineklerinden izole edilen 99 *Candida* şüpheli izolatın biri yeşil-mavi renkli ve mat koloniler (*C. tropicalis* şüpheli), 54'ü pembe renkli, ikisi açık pembe renkli koloniler (*C. krusei* şüpheli) ve 42'si krem/beyaz renkli koloniler oluşturdu.



Fotoğraf 3.1: İzolatların CCA’da makroskobik morfolojisi. A: *C. albicans* şüpheli yeşil renkli koloniler; B: *C. glabrata* şüpheli beyazımsı renkte koloniler (manda izolatu); C: krem/beyaz koloniler; D: *C. krusei* şüpheli pembe renkli koloniler (inek izolatu); E: *C. tropicalis* şüpheli yeşil-mavi renkli koloniler; F: *C. krusei* şüpheli açık pembe renkli koloniler (manda izolatu)

C. albicans’ın fenotipik olarak tanımlanmasında germ tüp oluşturabilme yeteneği ve Tween-80 ilaveli mısır unlu agarda klamidospor oluşturma özelliği dikkate alındı. Anadolu mandalarından izole edilen 93 *Candida* şüpheli izolatu ikisinde germ tüp ve klamidospor oluşturduğu belirlenirken, süt ineklerinden izole edilen 99 *Candida* şüpheli izolatta germ tüp ve klamidospor oluşumu gözlenmedi.



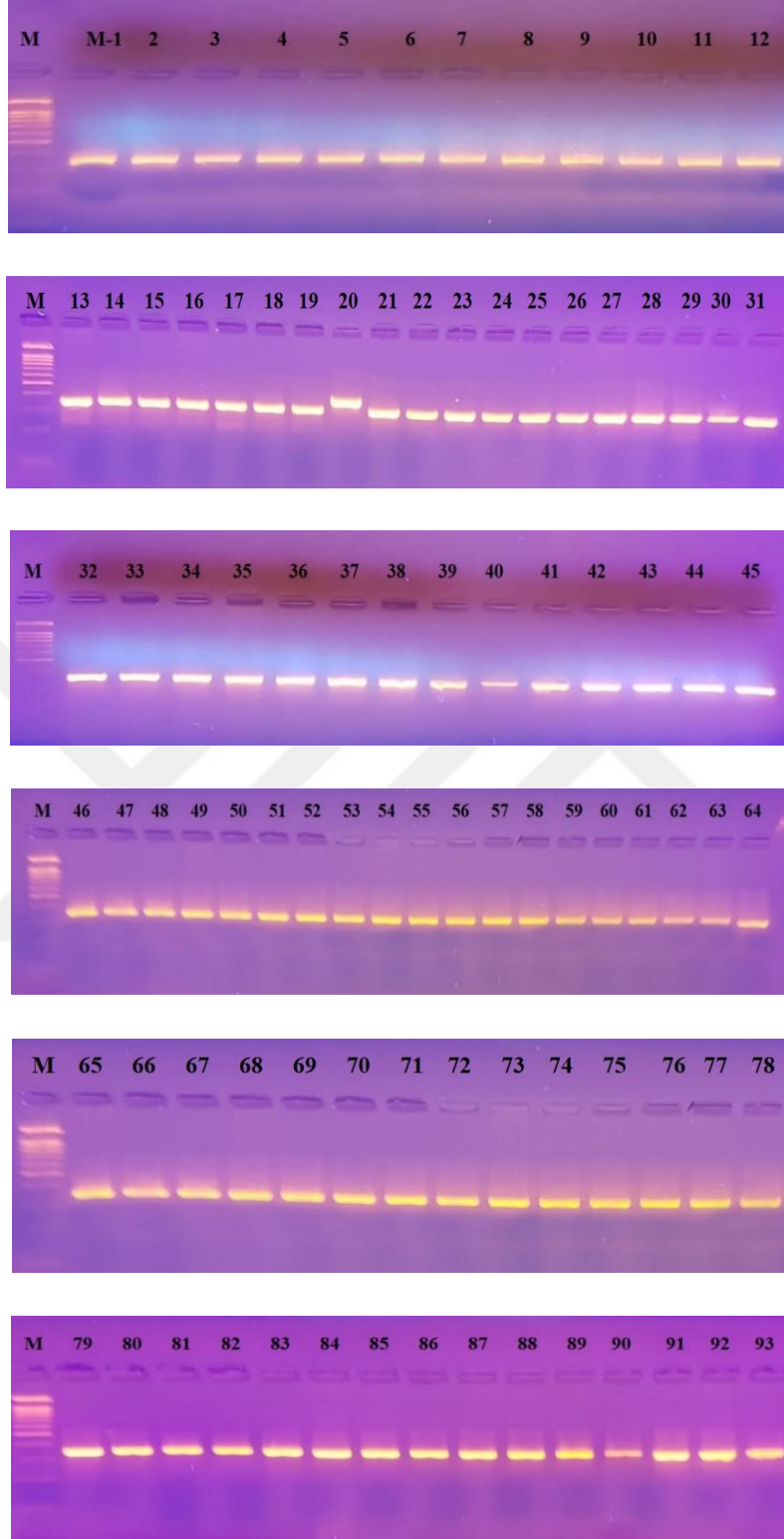
Fotoğraf 3.2: Mandalardan izole edilen *C. albicans* şüpheli izolatin germ tüp görüntüsü



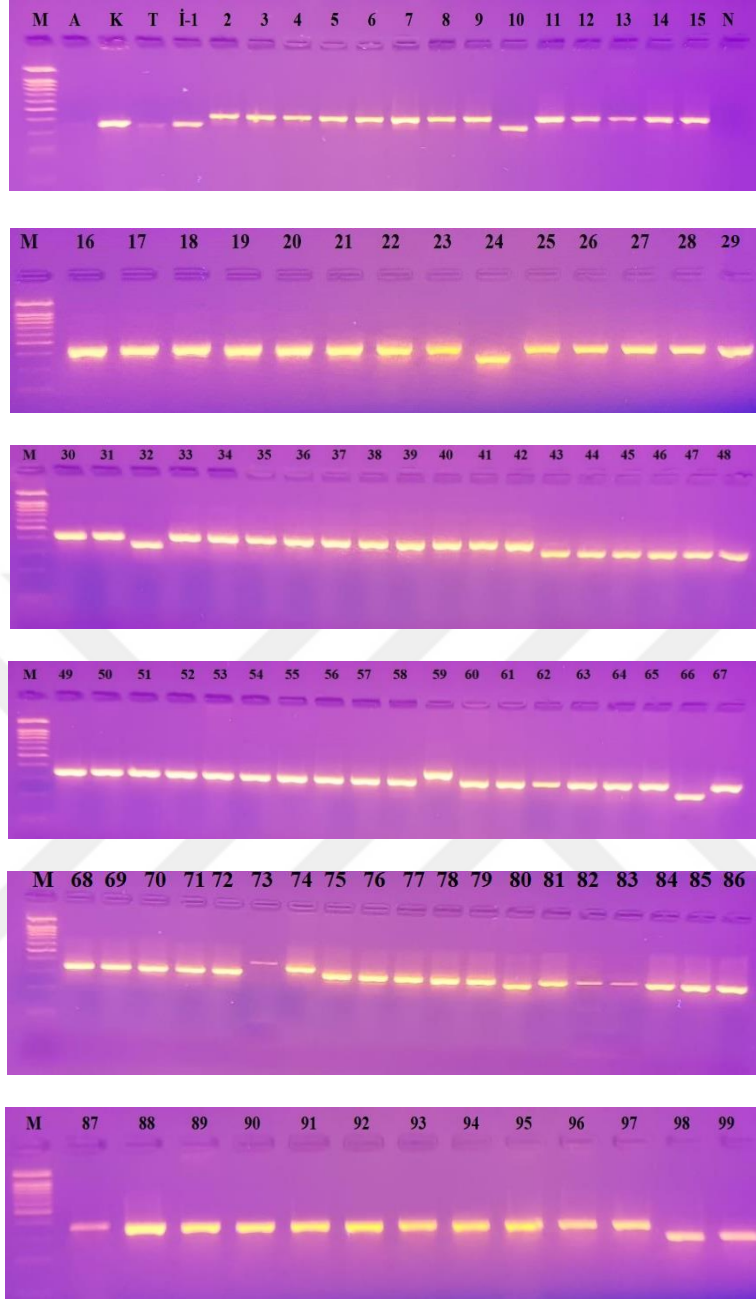
Fotoğraf 3.3: Mandalardan izole edilen *C. albicans* şüpheli izolatin klamidospor oluşumu görüntüsü

3.2. Moleküler İdentifikasyon Bulguları

Geleneksel yöntemler kullanılarak Anadolu mandalarından izole edilen 93 *Candida* şüpheli izolat ve süt ineklerinden izole edilen 99 *Candida* şüpheli izolatın doğrulanması amacıyla, ilk olarak moleküler teşhise yönelik araştırmaların hemen hepsinde kullanılan ve referans olarak verilen cins-spesifik universal *ITS* (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, *ITS4*) primerleri ile PZR uygulandı. Ancak, bu primerlerin çalışmada izole edilen *Candida* şüpheli izolatları ve bazı kontrol suşlarını doğrulayamaması nedeniyle, izolatlara ve kontrol suşlarına 5.8S rDNA'nın korunmuş bölgelerini içine alan ve ilk olarak bu çalışmada tasarlanan yeni *ITS* primerleri kullanılarak PZR uygulandı. PZR sonrasında 300-400 bp'da belirlenen spesifik bantlar *Candida* olarak değerlendirildi. Buna göre, Anadolu mandalarından izole edilen 93 ve süt ineklerinden izole edilen 99 izolatın tamamında *Candida* cins-spesifik bantlar görüldü. PZR işlemi sonunda Anadolu mandalarına ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri Fotoğraf 3.4'te, süt ineklerine ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri ise Fotoğraf 3.5'de gösterilmiştir.



Fotoğraf 3.4: Anadolu mandalarına ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri. M: Marker (100 bp); M-1-93: *Candida* izolatları (300-400 bp)



Fotoğraf 3.5: Süt ineklerine ait izolatlardan elde edilen jel görüntüleri. M: Marker (100 bp); A: *C. albicans* ATCC 10231; K: *C. krusei* ATCC 6258; T: *C. tropicalis* ATCC 750; N: Negatif kontrol (steril distile su); İ-1-99: *Candida* izolatları (300-400 bp)

3.3. Sekans Analizi ve Filogenetik Analiz

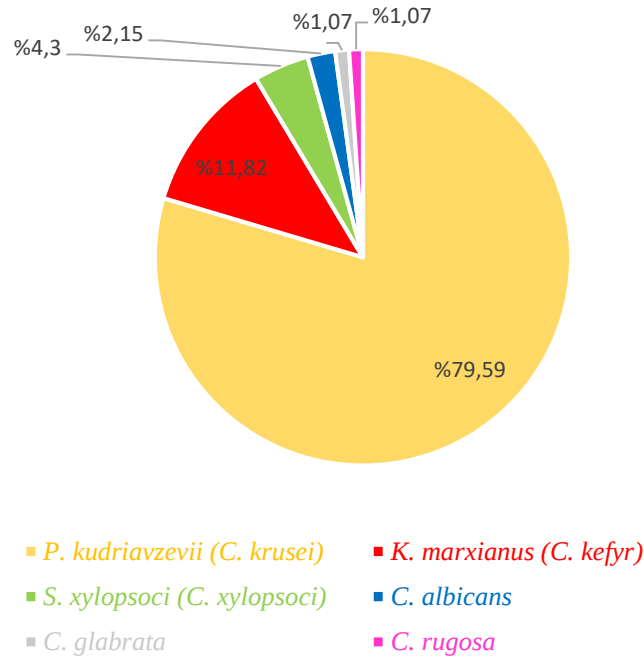
Dizi analizi sonucunda elde edilen sekans örneklerinin gen bankası ile karşılaştırılmaları sonrası, *Candida* türlerinin identifikasyonu tamamlandı. Buna göre; Anadolu mandası izolatlarının %79,59'u (74/93) *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*), %11,82'si (11/93) *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*), %4,3'ü (4/93) *Suhomyces xylopsoci* (*C. xylopsoci*), %2,15'i (2/93) *C. albicans*, %1,07'si (1/93) *C. glabrata* ve %1,07'si (1/93) *C. rugosa* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.3, Grafik 3.1). Süt ineklerinden elde edilen izolatların ise %54,54'ü (54/99) *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), %39,4'ü (39/99) *K. marxianus* (*C. kefir*), %4,04'ü (4/99) *C. xylopsoci*, %1,01'i (1/99) *C. parapsilosis* ve %1,01'i (1/99) *C. rugosa* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.4, Grafik 3.2). Mandalardan izole edilen izolatların ikisi *C. albicans* olarak tanımlanırken, süt ineklerinden *C. albicans* tanımlanamamıştır. Manda ve ineklerden izole edilen toplam 192 izolatın 190'ını non-*albicans* türleri oluşturdu.

Çizelge 3.3: Anadolu mandalarından tanımlanmış *Candida* türleri ve izolasyon oranları

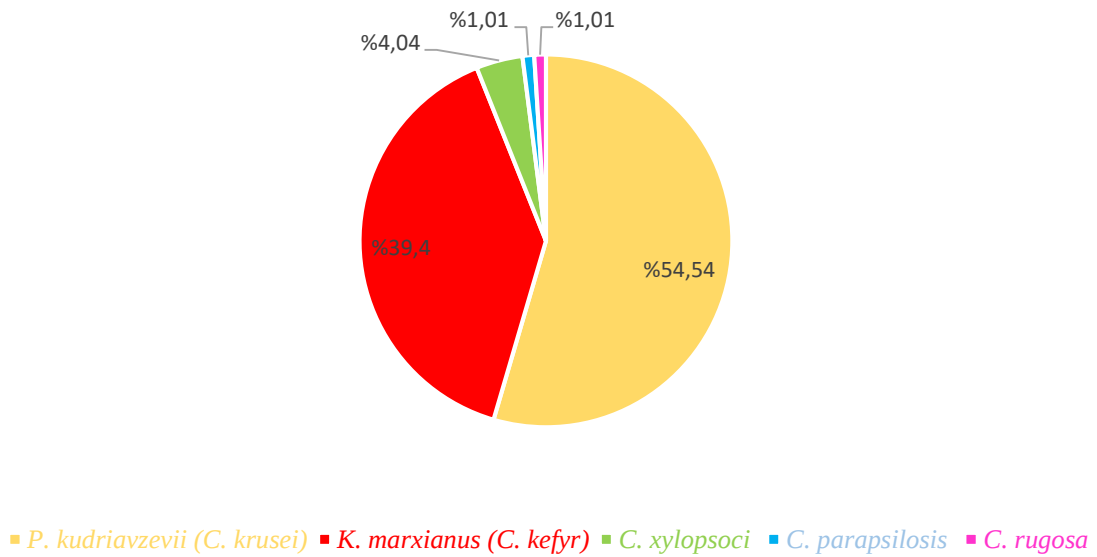
<i>Candida</i> spp.	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	74	79,59
<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)	11	11,82
<i>S. xylopsoci</i> (<i>C. xylopsoci</i>)	4	4,3
<i>C. albicans</i>	2	2,15
<i>C. glabrata</i>	1	1,07
<i>C. rugosa</i>	1	1,07
Toplam	93	100

Çizelge 3.4: Süt ineklerinden tanımlanmış *Candida* türleri ve izolasyon oranları

<i>Candida</i> spp.	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)	54	54,54
<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)	39	39,4
<i>C. xylopsoci</i>	4	4,04
<i>C. parapsilosis</i>	1	1,01
<i>C. rugosa</i>	1	1,01
Toplam	99	100



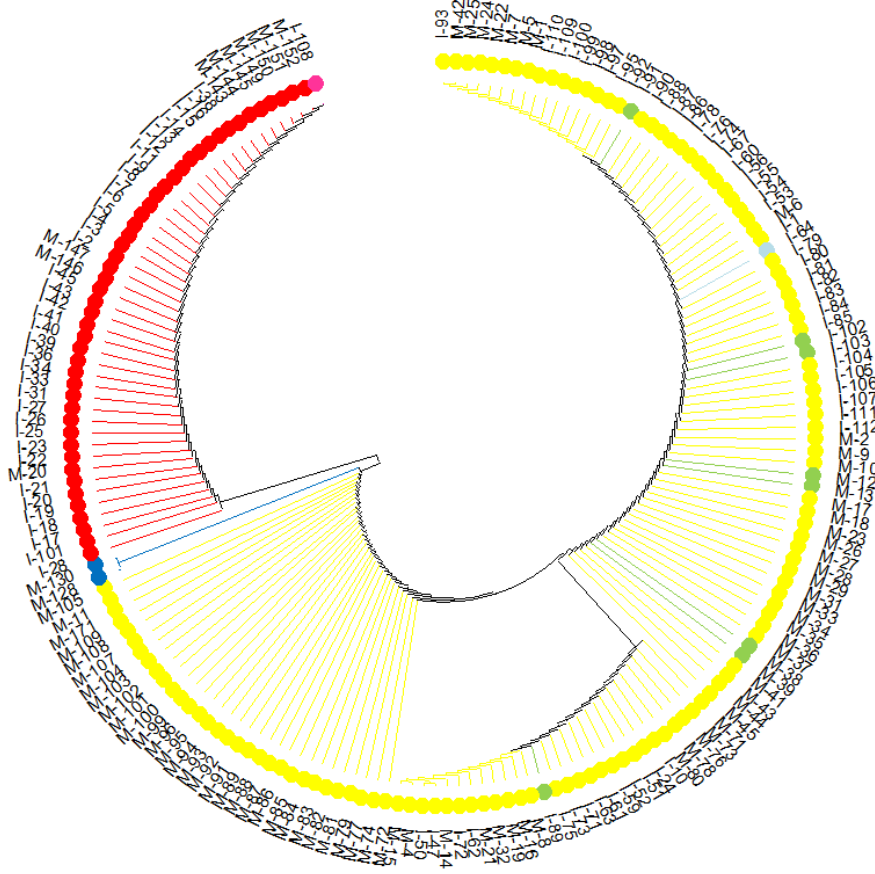
Grafik 3.1: Anadolu mandalarından identifiye edilen *Candida* türlerinin % grafik görünümü



Grafik 3.2: Süt ineklerinden identifiye edilen *Candida* türlerinin % grafik görünümü

Sekans analizi sonrası elde edilen nükleotid dizileri Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, ABD) kullanılarak düzenlendi ve birleştirildi. Daha sonra tüm diziler BioEdit 7.0.9 dizi hizalama yazılımında hizalandı. Eksik veri ve boşluklar da dahil olmak üzere tüm konumlar veri setinden çıkarılarak tüm diziler aynı

boyuta getirildi. Filogenetik analizde toplam 181 nükleotid dizisi kullanıldı. *Candida* türlerinin filogenetik yakınlığının belirlenmesi amacıyla, aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) kullanılarak evrimsel geçmiş çıkarıldı (Sneath ve Sokal, 1973). *Candida* türleri arasındaki evrimsel ilişki MEGA11 yazılım programında maksimum bileşik olabilirlik (maksimum likelihood) yöntemi (Tamura vd., 2004) kullanılarak analiz edildi. *Candida* türleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla filogenetik ağaç çizildi (Tamura vd., 2021). Sekans analizi sonrası identifiye edilen türler arasındaki evrimsel ilişkiler Grafik 3.3'de verilmiştir.



Grafik 3.3: Anadolu mandaları ve süt ineklerinden identifiye edilen *Candida* spp. taksonlarının evrimsel ilişkileri. M: manda; İ: inek. *C. rugosa*, *K. marxianus* (*C. kefyr*), *C. albicans*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *S. xylopoeci* (*C. xylopoeci*) ve *C. parapsilosis* renkli olarak gösterilmiştir.

3.4. Sonuçların Karşılaştırılması

Anadolu Mandalarından izole edilen ve SDA'da şüpheli olarak değerlendirilen 93 izolat ile süt ineklerinden izole edilen ve SDA'da şüpheli olarak değerlendirilen 99 izolata bu çalışmada tasarlanan cins-spesifik *ITS* primerleri kullanılarak uygulanan PZR sonrasında, SDA'dan elde edilen izolatların tamamının *Candida* cinsine ait olduğu belirlendi.

CCA'da Anadolu Mandalarından izole edilen 93 izolattan ikisi *C. albicans*, 78'i *C. krusei* ve biri *C. glabrata* şüpheli olarak belirlendi. Sekans analizi sonrasında bu izolatların ikisi *C. albicans* ve 74'ü *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) ve biri de *C. glabrata* olarak doğrulandı. CCA'da *C. krusei* şüpheli olarak değerlendirilen dört izolatın sekans analizi sonrasında *S. xylopsoci* (*C. xylopsoci*) olduğu belirlendi. Süt ineklerinden izole edilen 99 *Candida* şüpheli izolatın ise CCA'da biri *C. tropicalis* ve 56'sı *C. krusei* şüpheli olarak değerlendirildi. Sekans analizi sonuçlarına göre, bu izolatların 54'ü *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) olarak tanımlanırken, *C. krusei* şüpheli iki izolat *C. xylopsoci* olarak, *C. tropicalis* şüpheli bir izolat ise *C. rugosa* olarak tanımlanarak, Sekans sonuçlarıyla karşılaştırıldığında CCA'nın toplam 138 izolatın (manda ve inek izolatı) 131'ini (%94,9) doğru bir şekilde tanımladığı belirlendi.

Manda sütlerinden izole edilen 93 izolattan ikisinde germ tüp ve klamidospor oluşumu gözlenirken, yapılan sekans analizi sonrasında bu izolatların tamamı *C. albicans* olarak tanımlanarak, İnek sütlerinden elde edilen ve germ tüp ile klamidospor oluşumu gözlemlenmeyen 99 izolattın hiçbirisi sekans analizinde *C. albicans* olarak tanımlanmadı.

İzolatların fenotipik ve moleküler tanımlanmasında kullanılan yöntemlerin manda izolatları bazında karşılaştırılması Çizelge 3.5'te, inek izolatları bazında karşılaştırılması Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: Anadolu Mandası izolatlarının izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

İzolat sayısı	Germ tüp	Klamidospor	CCA'da Koloni Rengi	Sekans Analizi
74	Negatif	Negatif	Pembe	<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)
4	Negatif	Negatif	Açık Pembe	<i>S. xylopsoci</i> (<i>C. xylopsoci</i>)
11	Negatif	Negatif	Krem/Beyaz	<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)
1	Negatif	Negatif	Krem/Beyaz	<i>C. rugosa</i>
1	Negatif	Negatif	Beyazımsı	<i>C. glabrata</i>
2	Pozitif	Pozitif	Soluk yeşil	<i>C. albicans</i>

Çizelge 3.6: İnek izolatlarının izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

İzolat sayısı	Germ tüp	Klamidospor	CCA'da Koloni Rengi	Sekans Analizi
54	Negatif	Negatif	Pembe	<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>)
2	Negatif	Negatif	Açık Pembe	<i>C. xylopsoci</i>
39	Negatif	Negatif	Krem/Beyaz	<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefir</i>)
2	Negatif	Negatif	Krem/Beyaz	<i>C. xylopsoci</i>
1	Negatif	Negatif	Krem/Beyaz	<i>C. parapsilosis</i>
1	Negatif	Negatif	Yeşil Mavi	<i>C. rugosa</i>

3.5. *C. albicans*'ın Virülens Faktörlerine Ait Bulgular

Sekans analizi sonucunda Anadolu mandalarından izole edilen iki *C. albicans* izolatında *SAP1*, *ALS1* ve *PLB1* genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. PZR sonucuna göre; iki *C. albicans* izolatının da *SAP1* virülens genini taşıdığı, ancak *ALS1* ve *PLB1* genlerine sahip olmadığı belirlendi.



Fotoğraf 3.6: *C. albicans*'ta *SAP1* geni varlığına ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); 128-130: *SAP1* geni pozitif (224 bp) *C. albicans* izolatları; N: Negatif kontrol (steril distile su)



Fotoğraf 3.7: *C. albicans*'ta *ALS1* genini belirlemeye yönelik PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); 128-130: *ALS1* geni negatif *C. albicans* izolatları; N: Negatif kontrol (steril distile su)



Fotoğraf 3.8: *C. albicans*'ta *ALS1* genini belirlemeye yönelik PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); 128-130: *ALS1* geni negatif *C. albicans* izolatları; N: Negatif kontrol (steril distile su)

3.6. Antifungal Duyarlılık Testi Bulguları

Genotipik olarak tür düzeyinde identifikasyonu tamamlanan *Candida* türlerinin çeşitli antifungallere dirençlilikleri Mueller Hinton agarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Anadolu mandalarından izole edilen türlerin tamamı flusitozine dirençli iken, izole edilen türlerde itrakonazol (%98,9; n=92), amfoterisin B (%88,2; n=82), kaspofungin (%86; n=80) ve flukonazole (%83,9; n=78) karşı da yüksek direnç oranları elde edildi. Türlerin %90,3'ü (n=84) vorikonazole, %90,3'ü (n=84) ketokonazole duyarlıydı. Süt ineklerinden izole edilen 99 türün tamamında itrakonazol ve flusitozine direnç tespit edilirken, izole edilen türlerin 96'sında (%97) amfoterisin B'ye, 75'inde (%75,8) kaspofungine ve 63'ünde flukonazole (%63,6) karşı direnç belirlendi. Türlerin 96'sının (%97) ketokonazole, 91'inin (%92) ise vorikonazole duyarlı oldukları tespit edildi. Manda sütlerinden izole edilen türlerin antifungal dirençlilikleri Çizelge 3.7'de, inek sütlerinden izole edilen türlerin antifungal dirençlilikleri ise Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7: Anadolu mandalarından izole edilen türlerin antifungal ajanlara karşı dirençliliklikleri

Türler	Flukonazol (10 µg) % (n)			Vorikonazol (1 µg) % (n)			Kaspofungin (5 µg) % (n)			İtrakonazol (10 µg) % (n)			Ketokonazol (10 µg) % (n)			Amfoterisin B (20 µg) % (n)			Flusitozin (1 µg) % (n)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) (n=74)	0 (0)	0 (0)	100 (74)	90,5 (67)	6,8 (5)	2,7 (2)	2,7 (2)	2,7 (2)	94,6 (70)	0 (0)	0 (0)	100 (74)	93,2 (69)	6,8 (5)	0 (0)	5,4 (4)	2,7 (2)	91,9 (68)	0 (0)	0 (0)	100 (74)
<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyr</i>) (n=11)	90,9 (10)	9,1 (1)	0 (0)	90,9 (10)	0 (0)	9,1 (1)	81,8 (9)	0 (0)	18,2 (2)	0 (0)	0 (0)	100 (11)	81,8 (9)	9,1 (1)	9,1 (1)	9,1 (1)	18,2 (2)	72,7 (8)	0 (0)	0 (0)	100 (11)
<i>S. xylopsoci</i> (<i>C. xylopsoci</i>) (n=4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	75 (3)	25 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)
<i>C. albicans</i> (n=2)	100 (2)	0 (0)	0 (0)	100 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (2)	0 (0)	50 (1)	50 (1)	100 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (2)
<i>C. glabrata</i> (n=1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
<i>C. rugosa</i> (n=1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
Toplam (%) (n=93)	12,9 (12)	3,2 (3)	83,9 (78)	90,3 (84)	6,5 (6)	3,2 (3)	11,9 (11)	2,1 (2)	86 (80)	0 (0)	1,1 (1)	98,9 (92)	90,3 (84)	8,6 (8)	1,1 (1)	5,3 (5)	6,5 (6)	88,2 (82)	0 (0)	0 (0)	100 (93)

S: Susceptibility (Duyarlı); I: Intermediate (Orta seviye duyarlı); R: Resistant (Dirençli)

Çizelge 3.8: Süt ineklerinden izole edilen türlerin antifungal ajanlara karşı dirençlilikleri

Türler	Flukonazol (10 µg) % (n)			Vorikonazol (1 µg) % (n)			Kaspofungin (5 µg) % (n)			İtrakonazol (10 µg) % (n)			Ketokonazol (10 µg) % (n)			Amfoterisin B (20 µg) % (n)			Flusitozin (1 µg) % (n)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>P. kudriavzevii</i> (<i>C. krusei</i>) (n=54)	0 (0)	0 (0)	100 (54)	92,6 (50)	5,6 (3)	1,8 (1)	0 (0)	1,8 (1)	98,2 (53)	0 (0)	0 (0)	100 (54)	100 (54)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,8 (1)	98,2 (53)	0 (0)	0 (0)	100 (54)
<i>K. marxianus</i> (<i>C. kefyr</i>) (n=39)	89,8 (35)	0 (0)	10,2 (4)	89,8 (35)	5,1 (2)	5,1 (2)	7,7 (3)	48,7 (19)	43,6 (17)	0 (0)	0 (0)	100 (39)	92,3 (36)	7,7 (3)	0 (0)	2,6 (1)	0 (0)	97,4 (38)	0 (0)	0 (0)	100 (39)
<i>S. xylopsoci</i> (<i>C. xylopsoci</i>) (n=4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (4)	0 (0)	0 (0)	100 (4)
<i>C. parapsilosis</i> (n=1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	100 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
<i>C. rugosa</i> (n=1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
Toplam (%) (n=99)	36,4 (36)	0 (0)	63,6 (63)	92 (91)	5 (5)	3 (3)	4 (4)	20,2 (20)	75,8 (75)	0 (0)	0 (0)	100 (99)	97 (96)	3 (3)	0 (0)	2 (2)	1 (1)	97 (96)	0 (0)	0 (0)	100 (99)

S: Susceptibility (Duyarlı); I: Intermediate (Orta seviye duyarlı); R: Resistant (Dirençli)

4. TARTIŞMA

Mastitis, süt hayvanlarının sağlığını ve refahını tehdit eden, süt kalitesini ve miktarını etkileyerek ekonomik kayıplara ve süt endüstrisinde de en fazla zarara neden olan süt hayvanlarının en yaygın hastalığıdır (Ariton vd., 2022; Morales-Ubaldo vd., 2023). Süt ineklerinin itlaf edilmesi (%39,4), klinik mastitis (%32,3) ve subklinik mastitis (%18,2) gibi nedenlerle meydana gelen süt üretimindeki azalma, ekonomik etkinin temel unsurlarını oluşturan üç ana bileşen olarak kabul edilmektedir (De Vlieghe vd., 2012; Guimares vd., 2017). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2023 yılı Haziran ayı verilerine göre Türkiye'de sığır varlığı 16 520 965 baş iken manda varlığı 166 803 baş olarak bildirilmiştir. Hayvan sayılarında 2022 yılı verilerine göre, sığır varlığında %2'lik, manda varlığında %2,9'luk azalma meydana gelmiştir (TÜİK, 2023). Benzer şekilde, çiğ süt üretiminde inek sütü üretimi 2022 yılında bir önceki yıla göre %6,8 azalarak 19 912 135 ton olurken manda sütü üretimi %31,5 azalarak 43 589 ton olmuştur. TÜİK verilerinde, 2022 yılında çiğ süt üretiminin %92,3'n inek sütünden oluştuğu sadece %0,2'sinin ise manda sütünden elde edildiği bildirilmiştir (TÜİK, 2022). TÜİK verilerine göre, ülke ekonomisi için büyük önemi olan sığır ile manda varlığında ve çiğ süt üretiminde ciddi bir düşüş görülmektedir. Manda varlığı açısından düşüş olsa da, Afyonkarahisar özellikle manda yetiştiriciliği ve manda sütünden yapılan geleneksel Afyon kaymağı üretimi açısından ülke pazarında ve ekonomisinde önemli bir paya sahiptir (Yakan ve şeker, 2022; Seker ve Dogan, 2023).

Mastitisin infeksiyon nedenli etiyolojik ajanları arasında gösterilen mantarlara ilişkin gelişen mikotik mastitis, Türkiye'de ilk olarak Arda ve İstanbulluoğlu (1979) tarafından bildirilmiştir. Günümüzde hem dünyada, hem de Türkiye'de mastitis etiyolojisine yönelik araştırmalarda mikotik mastitis etkenlerinin varlığı rapor edilmekte ve süt hayvanlarında meydana gelen mastitis vakalarının %2-13'n fungal etkenlerden kaynaklandığı belirtilmektedir (zen vd., 2008; şeker ve zen, 2011; Dworecka-Kaszak vd., 2012; Cilvez ve Turkyilmaz, 2019; Hizlisoy vd., 2020; Kurt ve Ekşi, 2021; Yüksel Dolgun vd., 2022; Raheel vd., 2023; Miao vd., 2023). Mikotik mastitislerin epidemiyolojisinde; kontamine sütlerin makina veya elle sağılması, hayvan sahipleri ve veteriner hekimlerin nonspesifik, uzun süreli ve sık antibiyotik kullanımı,

kontamine antibiyotik, kanül ve enjektörlerin meme içi uygulanması gibi nedenlerin etkili olduğu bildirilmektedir (Dworecka-Kaszak vd., 2012; Hamadani vd., 2013; Hizlisoy vd., 2020).

Mastitisin sahadaki teşhisi genellikle, sütteki somatik hücre sayısının (SHS) belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Alhussien ve Dang, 2018; Moroni vd., 2018). Bu amaçla da, gelişmiş teknolojik ekipmanlara gerek duyulmayan basitçe uygulanabilen, kullanışlı, hızlı sonuç veren ve ekonomik bir test olması nedeniyle sahada en yaygın olarak kullanılan test California Mastitis Testdir (CMT) (Özenç vd., 2008; Özenç vd., 2019; Kumar vd., 2023). Genellikle subklinik mastitislerin teşhisi amacıyla kullanılan bu test, sütteki SHS miktarına yönelik kabaca sayısal değer vermekle birlikte, SHS'nin yüksek veya düşük olduğuna dair tahmini bir fikir verebilmektedir (Özenç vd., 2008; Goncagül vd., 2023). Cezayir'de ineklerde mikotik mastitise neden olan etkenleri araştıran bir çalışmada, mikotik mastitis etkeni olarak belirlenen 86 *Candida* izolatının 16'sının (%18,6) CMT skoru negatif olarak kayıt altına alınan ve bu nedenle de sağlıklı oldukları düşünülen ineklerden izole edildiği bildirilmiştir (Ksouri vd., 2015). Genel bir kanı olarak CMT'ye pozitif reaksiyon veren hayvanlara şüphe ile yaklaşılması önerilmektedir (Gezgen ve Seker, 2016). Bununla birlikte, CMT reaksiyonu negatif olarak belirlenen hayvanların meme loblarından da mastitis patojenlerinin izole edilmesi nedeniyle, CMT reaksiyonlarının, mikrobiyolojik kültür sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmakta ve mastitis teşhisinde mikrobiyolojik kültür altın standart olarak kabul edilmektedir (Özenç vd., 2008; Duarte vd., 2015; Gezgen ve Seker, 2016; Yilmaz ve Seker, 2022). Afyonkarahisar'da farklı laktasyon dönemlerindeki mandalardan izole edilen etkenler ile CMT sonuçları arasındaki ilişkiyi inceleyen mevsimsel bir araştırmada, manda mastitislerinde *Candida* türlerinin yoğun olarak izole edildiği dönemlerde CMT skorunda önemli bir artış görülmediği, ayrıca CMT negatif meme loblarından da izolasyon gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Özenç vd., 2008).

Bu Tez çalışmasında, 301 Anadolu mandasına ait 1188 meme lobuna ve 332 süt ineğine ait 1321 meme lobuna CMT uygulandı. Mandalarda CMT'ye pozitif reaksiyon veren toplam 394 meme lobundan 15, şüpheli reaksiyon veren 550 meme lobundan 30

ve negatif reaksiyon veren 244 meme lobundan 48 *Candida* şüpheli izolat elde edildi. İneklerde ise CMT pozitif 396 meme lobundan 42, CMT şüpheli 392 meme lobundan 42 ve CMT negatif 533 meme lobundan 15 *Candida* şüpheli izolat elde edildi. Elde edilen veriler diğer araştırmacıların (Özenç vd., 2008; Ksouri vd., 2015) bulguları ile karşılaştırıldığında, CMT skorlamasına göre izolat sayılarının dağılımı arasında farklılıklar olduğu belirlendi. Bu farklılıklarda, bazı araştırmacıların da (Sargeant vd., 2001; Sanford vd., 2006; Pyörälä, 2009) belirttiği gibi, CMT'nin spesifikite ve sensitivitesinin değişken olabilmesinin etkili olabileceği düşünüldü. Çalışmada, mandalarda daha yüksek oranda olmak üzere hem manda hem de ineklerde CMT negatif meme loblarından da üreme tespit edildi. Bu sonuç, subklinik mastitis teşhisinde CMT'nin tek başına yeterli olmayabileceğini ve bazı araştırmacılar tarafından vurgulandığı gibi (Özenç vd., 2008; Duarte vd., 2015; Gezgen ve Seker, 2016; Yılmaz ve Seker, 2022), CMT bulgularının mikrobiyolojik kültürle birlikte değerlendirilmesinin daha sağlıklı sonuçlara ulaşmada etkili olabileceğini düşündürdü.

Mastitisli ruminantlardan izole edilen Fungal mastitis patojenleri arasında en sık karşılaşılanlar *Candida* türleridir (Özenç vd., 2008; Erbaş vd., 2017; Sonmez ve Erbas, 2017; Cilvez ve Türkyılmaz, 2019; Khalaf vd., 2021; Awandkar vd., 2023; Raheel vd., 2023). *Candida* cinsi içerisinde mastitislerden izole edilen en yaygın tür *C. albicans* olarak kabul edilse de son yıllardaki araştırmaların çoğunda non-*albicans* türlerin izolasyonunda artış görülmektedir (Dworecka-Kaszak vd., 2012; Erbaş vd., 2017; Du vd., 2018; Ibrahim vd., 2019; Hizlisoy vd., 2020; Sav ve Öztürk, 2022; Raheel vd., 2023; Miao vd., 2023).

Mastitisli ruminantlardan *Candida* türlerinin izolasyonunu amaçlayan araştırmaların genellikle süt inekleri üzerinde yoğunlaştığı, etkenlerin mandalardan izolasyonuna yönelik ise sınırlı sayıda çalışma (Moshref, 2004; Şeker ve Özenç, 2011; Khalaf vd., 2021; Mohamed vd., 2022; Hassan vd., 2023) olduğu dikkat çekmektedir. Bu çalışmalarda, mastitisli sütlerden izole edilen türlerin yaygınlığı ve dağılımı açısından farklılıklar bulunmaktadır. Mısır'da yapılan doktora tez çalışmasında, 104 sağmal mandaya ait 393 meme lobu süt örneğinden en yüksek oranda *C. albicans*'ın (%32,9) izole edildiği, bu etkeni *C. tropicalis* (%25,6), *C. parapsilosis* (%15,9), *C.*

krusei (%15,9) ve *C. rugosa*'nın (%9,8) takip ettiği bildirilmiştir (Moshref, 2004). Mısır'da yapılan ve farklı hayvan sütlerini içeren bir başka çalışmada 46 manda sütü örneğinden 15 (%32,6) *Candida* spp. izolasyonu yapıldığı, 15 izolatın beşinin *C. albicans*, ikisinin *C. krusei*, ikisinin *C. glabrata*, üçünün *C. tropicalis* ve üçünün de diğer *Candida* türleri olarak tanımlandığı belirtilmiştir (Khalaf vd., 2021). Mohamed vd. (2022) tarafından subklinik mastitisli mandalardan maya ve küfleri izole etmek için yapılan bir başka araştırmada, 75 subklinik mastitisli süt örneğinin 55'inden maya ve küflerin ürediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, *Candida* cinsi mayalardan sadece *C. albicans*'ın identifiye edildiği ve bu etkenin tek başına izolasyon oranının %33,33 (15/55) olduğu vurgulanmıştır. Bir başka araştırmada, subklinik mastitisli mandaları tespit etmek için White Side Testi (WST) uygulanan ve teste pozitif reaksiyon veren 20 mandadan alınan süt örneklerinden 30 maya kolonisi izole edildiği, izolatların *C. albicans* %46,67 (14/30), *C. parapsilosis* %30 (9/30) ve *C. krusei* %23,33 (7/30) olarak identifiye edildiği belirtilmiştir (Hassan vd., 2023).

Türkiye'de Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada klinik ve subklinik mastitisli Anadolu mandalarından 324 meme lobu süt örneğinin incelendiği, örneklerden 66 *Candida* izolatu elde edildiği ve izolatların identifikasyonunun API 20C AUX yeast ticari identifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada identifiye edilen türler; *C. krusei* (18/66), *C. rugosa* (11/66), *C. kefyr* (8/66), *C. tropicalis* (7/66), *C. albicans* (6/66), *C. zeylanoides* (4/66), *C. parapsilosis* (4/66), *C. guilliermondii* (3/66), *C. famata* (3/66), *C. glabrata* (2/66) ve *Candida ciferrii* (1/66) olarak verilmiştir (Şeker ve Özenc, 2011).

Mastitisli ineklerden *Candida* türlerinin izolasyonuna yönelik yapılan araştırmaların sayısı mandalara kıyasla daha fazladır. Danimarka'da, mastitis nedeni olarak *Candida* türlerinin araştırıldığı bir çalışmada, mastitisli süt ineklerine ait toplam 2896 meme lobu süt örneği incelenmiştir. Bir yıl süren incelemeler sonucunda *Candida* kaynaklı mastitis oranı %1,2 (n=35) olarak belirlenmiş ve izole edilen türler *C. krusei* (n=17), *C. rugosa* (n=6), *C. kefyr* (n=6), *C. tropicalis* (n=3), *Candida catenulata* (n=2) ve *Candida valida* (n=1) olarak bildirilmiştir (Aalbæk vd., 1994). Yunanistan'ın kuzeyinde 1997-2001 yılları arasında 580 süt ineğine ait klinik mastitisli 608 meme

lobu süt örneği mayalar yönünden incelenmiş ve API 20C AUX yeast identifikasyon kiti kullanarak 34 (%5,59) *Candida* türü belirlenmiştir. Türler arasında en yüksek izolasyon oranına *C. tropicalis*'in (%41,18; n=14) sahip olduğu, bu oranı *C. krusei* (%17,65; n=6), *C. albicans* (%11,76; n=4), *C. kefir* (%11,76; n=4), *C. parapsilosis* (%8,82; n=3) ve *C. rugosa*'nın (%8,82; n=3) izlediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, mayaların meme bezi patolojisinde açıkça rol oynadığı vurgulanmıştır (Bourtzi-Hatzopoulou vd., 2003). Brezilya'da de Casia Dos Santos ve Marin (2005) tarafından 37 çiftlikteki mastitisli ineklerden 260 meme lobu süt örneği *Candida* türleri yönünden incelenmiştir. Çalışmada, klasik izolasyon yöntemleri kullanılarak, örneklerden 45 (%17,31) *Candida* türü belirlenmiş ve türlerin dağılımı *C. krusei* (n=20), *C. rugosa* (n=11), *C. albicans* (n=4), *C. guilliermondii* (n=4), *C. parapsilosis* (n=2), *C. zeylanoides* (n=1), *Candida vini* (n=1), *C. famata* (n=1) ve *C. tropicalis* (n=1) olarak verilmiştir. Brezilya'da mastitisli ineklerden *Candida* türlerinin izole edilmesi amacıyla yapılan başka bir çalışmada, 428 meme lobu süt örneğinden 55 (%12,8) *Candida* izolatu elde edilmiş ve en sık izole edilen türler *C. krusei* (n=19), *C. parapsilosis* (n=14), *C. tropicalis* (n=10), *C. albicans* (n=7), *C. glabrata* (n=2), *C. rugosa* (n=1) ve diğer *Candida* türleri (n=2) olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar, elde ettikleri bu sonuçların NAC türlerinin ineklerde mikotik mastitiste önemli rol oynayabileceğini düşündüklerini vurgulamışlardır (Sartori vd., 2014). Meksika'da mastitisli ineklere ait toplam 1095 meme lobu süt örneği klasik kültürel yöntemler ve fenotipik testler kullanılarak maya türleri yönünden araştırılmış, 20 farklı *Candida* türü identifiye edilmiş ve en yüksek oranda izole edilen türlerin *C. glabrata* (%30,14) ve *C. krusei* (%27,65) olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, mastitisli meme loblarından sadece 11 (%3,9) *C. albicans* izole edildiğini, bu nedenle de, NAC türlerinin ineklerde mikotik mastitiste daha etkin bir rol oynayabileceğini vurgulamışlardır (Zaragoza vd., 2011). Toxqui-Munguia vd. (2022) tarafından Meksika'da yapılan başka bir çalışmada, subklinik mastitisli 52 meme lobu süt örneğinden klasik kültürel yöntemler ve CHROMagar kullanılarak dokuz *C. glabrata*, beş *C. krusei* ve bir *C. lipolytica* izole edildiği bildirilmiştir. Polonya'da yapılan bir araştırmada, 2122 meme lobu süt örneğinde 145 (%6,83) *Candida* türü belirlendiği, türler arasında en yüksek izolasyon oranlarına *C. krusei* (%41,33; n=62), *C. kefir* (%32; n=44) ve *C. lusitaniae*'nin (%11,33; n=17) sahip olduğu, diğer türlerin ise daha düşük oranlarda belirlendiği rapor edilmiştir (Wawron vd., 2010). Dworecka-

Kaszak vd. (2012) tarafından Polonya'da yapılan başka bir çalışmada, mastitisli 44 ineğe ait 66 meme lobu süt örneği incelenmiştir. Çalışmada, klasik kültürel yöntemleri takiben, API ID32C yeast identifikasyon kiti kullanarak identifiye edilen izolatlardan rastgele seçilen bazı izolatlar PZR ile doğrulanmıştır. Çalışma sonucunda 55 (%5,59) *Candida* izolatı belirlenmiş ve identifiye edilen *Candida* türleri; *C. parapsilosis* (n=25), *C. krusei* (n=15), *C. lusitaniae* (n=5), *C. famata* (n=5), *C. guilliermondii* (n=3), *C. tropicalis* (n=1) ve *C. albicans* (n=1) olarak bildirilmiştir. Japonya'da 3244 meme lobunun örneklendiği bir çalışmada, izole edilen 58 mikotik izolata uygulanan cins-spesifik PZR sonrası, izolatların 23'ünün *Candida* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışmada izolatlara sekans analizi yapılmış ve türler *C. tropicalis* (n=14), *C. rugosa* (n=3), *C. albicans* (n=1), *Candida ethanolica* (n=1), *C. parapsilosis* (n=1), *Candida maltosa* (n=1), *Candida pararugosa* (n=1) ve *Candida freyschussii* (n=1) olarak identifiye edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, sekans analizi ile *P. kudriavzevii* (*C. krusei*; n=22), *Clavispora lusitaniae* (*C. lusitaniae*; n=5) ve *K. marxianus* (*C. kefir*; n=4) türlerinin de identifikasyonlarını gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir (Hayashi vd., 2013). Mısır'da antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen kronik mastitisli 40 meme lobu süt örneğinden 37 mantar izolatı elde edilmiş ve bunların 24'ü PZR ile *C. albicans* olarak bildirilmiştir (Bakr vd., 2015). Eldesouky vd. (2016) tarafından Mısır'da mastitisli süt ineklerinde *Candida* türlerinin prevalansı ve *C. albicans*'ın moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada, 150 süt örneğinden 41'inde (%27,3) *Candida* türü identifiye edilmiştir. İdentifiye edilen türlerin %29,27'si *C. albicans* (n=12), %19,51'i *C. tropicalis* (n=8), %19,51'i *C. guilliermondii* (n=8), %14,63'ü *C. glabrata* (n=6), %12,20'si *C. krusei* (n=5) ve %4,88'i *C. kefir* (n=2) olduğu rapor edilmiştir. Mısır'da *C. albicans*'ın identifikasyonu ve virülens genleri varlığının moleküler yöntemler kullanılarak araştırıldığı bir başka çalışmada, mastitisli 50 meme lobu süt örneğinden dört (%8) *C. albicans*, üç (%6) *C. parapsilosis* ve iki (%4) *C. tropicalis* identifiye edildiği bildirilmiştir (Mousa vd., 2016). Raheel vd. (2023) tarafından yine Mısır'da yapılan bir araştırmada, 120 inek sütünden izole edilen *Candida* türleri *C. guilliermondii* (%26,7; n=4), *C. tropicalis* (%20; n=3), *C. albicans* (%20; n=3), *C. parapsilosis* (%13,3; n=2) ve *C. kefir* (%13,3; n=2) olarak rapor edilmiştir. Çin'in Ningxia bölgesinde MALDI TOF-MS sistemiyle klinik mastitisli ineklerin 482 meme lobu sütünden, 43 *Candida* (%16,8) türü identifiye edilmiştir.

İdentifiye edilen türler *C. krusei* (%82,38; n=14), *C. parapsilosis* (%35,29; n=6), *C. lusitaniae* (%29,41; n=5), *C. lipolytica* (%29,41; n=5), *C. rugosa* (%23,53; n=4), *C. tropicalis*, (%17,65; n=3), *C. utilis* (%17,65; n=3) ve *C. sphaerica* (%17,65; n=3) olarak belirtilirken, araştırmada *C. albicans* tespit edilemediği bildirilmiştir (Du vd., 2018).

Türkiye’de de dünyadaki çalışmalara benzer şekilde, süt ineklerinden *Candida* izolasyonunu amaçlayan araştırma sayısı oldukça fazladır. İzmir ve Afyonkarahisar’da örneklenen 422 ineğe ait 1620 meme lobu örneğinden 207 *Candida* izolatu API 20C AUX yeast identifikasyon kiti kullanılarak tiplendirilmiştir. Çalışmada, en yaygın izole edilen türün *C. krusei* (%34,8; n=72) olduğu ve bunu *C. rugosa* (%16,4; n=34), *C. kefir* (%12,6; n=26), *C. albicans* (%10,1; n=21), *C. tropicalis* (%9,2; n=19), *C. zeylanoides* (%5,8; n=12), *C. parapsilosis* (%4,3; n=9), *C. guilliermondii* (%3,4; n=7), *C. famata* (%1,9; n=4) ve *C. glabrata*’nın (%1,4; n=3) izlediği belirtilmiştir (Şeker, 2010). Aydın ili’nde subklinik mastitisli 152 süt ineğinden 339 meme lobu süt örneği toplanmış ve süt örneklerinden 41’inde (%12,1) API 20C AUX yeast identifikasyon sistemiyle maya identifikasyonu yapılmıştır. İdentifikasyon sonucunda 34 *Candida* türü belirlenirken bunlar; *C. krusei* (n=15), *C. kefir* (n=12), *C. guilliermondii* (n=3), *C. famata* (n=2), *Candida utilis* (n=1) ve *C. rugosa* (n=1) olarak rapor edilmiştir (Türkyılmaz ve Kaynarca 2010). Erbaş vd. (2017) tarafından yine Aydın ili’nde yapılan bir çalışmada, 260 mastitisli süt örneğinden 46 (%17,7) *Candida* izolasyonu yapılmış, ticari identifikasyon kiti ve nested PZR sonuçlarına göre; *C. tropicalis* (%26,1; n=12), *C. parapsilosis* (%21,7; n=10), *C. kefir* (%17,4; n=8), *C. krusei* (%17,4; n=8), *C. rugosa* (%13; n=6) ve *C. glabrata*’nın (%4,3; n=2) identifiye edildiği bildirilmiştir. Tekirdağ ili’nde mastitisli 100 süt örneğinden 25 maya izolasyonu yapılmış ve izolatların API 20C AUX kiti ile identifikasyonu sonucunda; *C. krusei* (n=8), *C. albicans* (n=5), *C. kefir* (n=3), *Candida boidinii* (n=3), *C. famata* (n=3), *C. sphaerica* (n=2) ve *Candida thermophila* (n=1) identifiye edilmiştir (Sonmez ve Erbaş, 2017). Cilvez ve Türkyılmaz (2019) tarafından Denizli’de subklinik mastitisli süt ineklerinden 400 meme lobu süt örneği klasik kültürel yöntemlerle incelenmiş ve 96 (%24) *Candida* izolatu belirlenmiştir. İzolatlara yapılan sekans analizi sonrasında 96 izolatın 95’i *Candida* türü olarak doğrulanmış ve türler; *C. parapsilosis* (%23,2; n=22), *C. krusei* (%22,1; n=21), *C. kefir* (%20; n=19), *C. albicans* (%16,8; n=16), *C. tropicalis* (%9,5; n=9), *C. glabrata*

(%4,2; n=4), *C. guilliermondii* (%3,2; n=3) ve *C. lipolytica* (%1,1; n=1) olarak identifiye edilmiştir. Burdur'da mastitis sorunu olan işletmelerdeki 178 süt ineğinden 686 meme lobu süt örneğinin mayalar yönünden incelendiği, örneklerden 49'undan (%7,14) maya izolasyonu yapıldığı ve bu izolatlardan beşinin (%10,2) klasik yöntemlerle *C. albicans* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir (Sav ve Öztürk, 2022). Yüksel Dolgun vd. (2022) tarafından İzmir'de klinik mastitisli 100 süt örneğinden klasik yöntemlerle 23 (%23) *Candida* izolatu elde edildiği, izolatların kromojenik agar kullanılarak 20'sinin (%86,96) *C. krusei*, ikisinin (%8,70) *C. albicans* ve birinin (%4,35) *C. tropicalis* olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada izolatların sekans analizi de yapıldığı ve sekans sonuçlarına göre türlerin 20'sinin *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), ikisinin *C. albicans* ve birinin de *C. tropicalis* olarak doğrulandığı vurgulanmıştır.

Bu Tezde; Anadolu mandalarına ait 1188 meme lobundan izole edilen 93 *Candida* (%7,82) izolatu ve süt ineklerine ait 1321 meme lobundan izole edilen 99 *Candida* (%7,49) izolatına, ITS bölgesini hedef alan ve ilk kez bu çalışmada tasarlanan cins-spesifik primerler kullanılarak uygulanan PZR ile tüm izolatların *Candida* cinsine ait olduğu doğrulandı (Fotoğraf 3.4 ve 3.5). PZR ile *Candida* olduğu belirlenen tüm izolatların tek yön Sanger sekans analizi uygulandı. Buna göre, mandalardan elde edilen izolatların %79,59'u *P. kudriavzevii* (*C. krusei*, n=74), %11,82'si *K. marxianus* (*C. kefir*, n=11), %4,3'ü *S. xylopyllosi* (*C. xylopyllosi*, n=4), %2,15'i *C. albicans* (n=2), %1,07'si *C. glabrata* (n=1) ve %1,07'si *C. rugosa* (n=1) olarak identifiye edildi. Süt ineklerinden izole edilen türlerin ise %54,54'ü *P. kudriavzevii* (*C. krusei*, n=54), %39,4'ü *K. marxianus* (*C. kefir*, n=39), %4,04'ü *C. xylopyllosi* (n=4), %1,01'i *C. parapsilosis* (n=1) ve %1,01'i *C. rugosa* (n=1) olarak identifiye edilirken, süt ineklerinden *C. albicans* identifiye edilemedi. Çalışmada hem mandalar hem de süt ineklerinden en yüksek oranda izole edilen türler *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) ve *K. marxianus* (*C. kefir*) oldu. Çalışmada izole edilen türlerin tamamının NAC türleri olması konu ile ilgili diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermekle birlikte, türlerin dağılımı ve izolasyon oranları farklılık gösterdi. Ortaya çıkan bu farklılıkta, örneklenen hayvan ve meme lobu sayıları, hayvanların mastitis durumları (subklinik ya da klinik mastitis), coğrafik ve epidemiyolojik farklılıklar, türlerin orijini

gibi faktörlerin yanı sıra, kullanılan izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin farklılığının da etkili olabileceği düşünüldü. Mastitisli ruminantlardan *Candida* türlerinin izolasyonuna yönelik yapılan ve yukarıda detayları ile verilen araştırmaların büyük bir kısmında izolasyon ve identifikasyonun, geleneksel kültürel yöntemler, fenotipik ve morfolojik değerlendirmeler ve ticari identifikasyon kitleri kullanılarak gerçekleştirildiği görülmektedir. Sınırlı sayıda araştırmada ise, izolatlar genelde aynı olduğu belirlenen cins-spesifik universal *ITS* primerleri (*ITS1/2*, *ITS3/4*) kullanılarak PZR uygulandığı dikkati çekmiştir. Genel olarak, tüm mantarlarda ortak olduğu bilinen 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt ünitelerinden oluşan üç ribozomal gen bölgesi bulunmakta, ancak bu bölgelerin çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş bölgeler olmaları nedeniyle tür düzeyinde identifikasyon için uygun olmadıkları belirtilmektedir. Bununla birlikte, 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt ünitelerini kodlayan üç gen bölgesinin arasında yer alan ve protein kodlamayan bölge olarak bilinen *ITS* bölgelerinin ise, özellikle tür düzeyinde identifikasyona uygun bölgeler oldukları vurgulanmaktadır (Chen vd., 2001; Leaw vd., 2006; Yang vd., 2018). Bu çalışmada da ilk olarak, moleküler teşhise yönelik araştırmaların hemen hepsinde kullanılan ve referans olarak verilen cins-spesifik universal *ITS* (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, *ITS4*) primerleri kullanıldı. Ancak, bu primerler çalışmada izole ettiğimiz *Candida* şüpheli izolatları ve bazı kontrol suşlarını PZR'da doğrulayamadı. Bu nedenle sunulan çalışmada, fenotipik izolasyonu takiben elde edilen izolatlar için daha geniş bir *ITS* bölgesini içeren, daha önce başka bir araştırmada kullanılmamış yeni *ITS* primerleri sentezletildi ve izolatlar bu primerler ile PZR uygulandı. Önceki universal primerler (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, *ITS4*) ile doğrulaması yapılamayan çok sayıda izolat, yeni sentezletilen *ITS* primerleri ile *Candida* olarak doğrulandı. PZR'ı takiben de izolatlar tür bazında identifikasyonda daha hassas ve net sonuç veren sekans analizi yapıldı. Diğer araştırmalarla kıyaslandığında, hem bu çalışmada yeni tasarlanan primer dizilerinin kullanımı, hem de uygulanan sekans analizinin izolasyon oranlarındaki farklılıkta en etkili faktör olabileceği düşünüldü. Bunun yanı sıra, sunulan çalışmada elde edilen *C. albicans* izolasyon oranı beklenenden daha düşüktü. Bazı araştırmacılar, *C. albicans*'ın daha çok klinik ve/veya kronik mastitise neden olabileceğini ve bu nedenle de klinik ve/veya kronik mastitisli ruminantlardan izolasyon oranının daha yüksek olduğunu vurgulamaktadır (Bakr vd., 2015; Eldesouky vd., 2016; Mousa vd., 2016). Bu çalışmada örneklenen hayvanlarda klinik veya kronik

mastitis tespit edilmemesinin, *C. albicans*'a ait düşük izolasyon oranını açıklayabilir nitelikte olabileceği düşünüldü. Ayrıca, diğer araştırmacıların bulgularında verilen yüksek *C. albicans* izolasyon oranlarında, genellikle mastitislerden sorumlu primer maya patojeni olarak bu türün düşünülmesi ve mastitisli hayvanlardan bu türün izolasyonuna ağırlık verilmesinin etkili olabileceği düşünüldü.

Ruminantlarda mastitis patojeni *Candida* türleri arasında yer alan *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*'in hızlı tanımlanmasında ticari olarak farklı firmalara ait farklı kromojenik besiyerlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Cilvez ve Turkeyilmaz, 2019; AL-Abedi, 2020; Yüksel Dolgun vd., 2022). Cilvez ve Turkeyilmaz (2019) tarafından yapılan ve *Candida* Kromojenik Agardaki (CCA) izolasyon oranları ile sekans analizi sonuçlarının karşılaştırılmalı olarak verildiği bir çalışmada, CCA'nın 47 *Candida* izolatının 46'sını doğru bir şekilde tanımladığı, özellikle *C. tropicalis* ve *C. krusei* tanımlamalarında %100 başarı gösterdiği, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. albicans* dışındaki diğer türlerin birbirlerine yakın renk tonlarında üreme göstermelerinden dolayı bu üç tür dışındaki mayaları tür düzeyinde belirleyemediği belirtilmiştir.

Bu Tez çalışmasında kromojenik besiyeri olarak kullanılan CCA'nın manda ve ineklerden elde edilen 138 izolatın 131'ini (%94,9) doğru bir şekilde tanımladığı belirlendi. CCA'nın; mandalardan izole edilen *C. krusei* izolatlarını belirlemede %94,9 (74/78), *C. albicans* ve *C. glabrata* izolatlarını belirlemede ise %100 başarılı olduğu tespit edilirken, süt ineklerinden elde edilen *C. krusei* izolatlarını belirlemede başarı oranı %96,4 (54/56) olarak bulundu. Bununla birlikte, süt ineklerinden izole edilen ve CCA'da *C. tropicalis* şüpheli olarak değerlendirilen bir izolatın ise sekans analizi sonrası *C. rugosa* olduğu tespit edildi. Elde edilen verilere göre, CCA'nın sadece *C. krusei*, *C. albicans* ve *C. glabrata* türlerini tanımlamada başarılı olduğu, üretici firmanın *C. tropicalis*'i de tanımladığını belirttiği bu kromojenik besiyerinin *C. tropicalis*'i yanlış pozitif olarak tanımladığı belirlendi. Bununla birlikte, üretici firma bilgilendirmesinde mor-pembe renkli kolonilerin *C. krusei* olarak tanımlanması gerektiği belirtilmektedir. Ancak çalışmada CCA'da *C. krusei* şüpheli olarak değerlendirilen ve sekans analizi sonrası *C. krusei* oldukları doğrulanan izolatların pembe renkli koloniler

oluşturduğu, bu nedenle de açık pembe tonlarda oluşan kolonilerin de *C. krusei* olarak değerlendirilmesine neden olduğu görüldü. İnkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı gibi faktörlerin türlerin kromojenik agarlardaki pigmentasyon gelişimini etkileyebilmesi nedeniyle, mikolojik tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bu besiyerlerinde şüpheli olduğu belirlenen izolatların identifikasyonlarının biyokimyasal veya moleküler yöntemler kullanılarak desteklenmesinin önemli olabileceği düşünüldü.

C. albicans'ın önemli virülens faktörleri arasında yer alan hidrolitik enzimler, *C. albicans*'ın doku istilasını kolaylaştıran, konakçı hücrelerine adhezyonunu sağlayan ve antifungal direnç gelişiminde rol oynayabilen faktörler olarak kabul edilmektedir (Eldesouky vd., 2016; Talapko vd., 2021). *C. albicans*'ın özellikle insan klinik izolatlarında bu hidrolitik enzimleri kodlayan *SAP1*, *PLB1* ve *ALS1* genlerinin varlığı virülens ile ilişkilendirilmektedir (Shrief vd., 2019; Lim vd., 2021). Bununla birlikte, mastitislerden izole edilen *C. albicans* izolatlarında bu genlerin varlığının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır (Eldesouky vd., 2016; Mousa vd., 2016; AL-abidy vd., 2019; Sav ve Öztürk, 2022). Eldesouky vd. (2016) tarafından klinik mastitisli ineklerden izole edilen ve PZR ile doğrulanan sekiz *C. albicans* izolatının tamamının *PLB1* geni taşıdığı bildirilmiştir. Mısır'da süt ineklerinde yapılan bir araştırmada, mastitisli süt örneklerinden izole edilen dört *C. albicans* izolatından ikisinin *PLB1* geni taşıdığı, birinin hem *PLB1* hem de *ALS1* geni taşıdığı ve bir izolatın ise *PLB1*, *ALS1* ve *SAP1* genleri taşıdığı tespit edilmiştir (Mousa vd., 2016). Irak'ta mikotik mastitisli ineklerden identifiye edilen 60 adet *C. albicans* izolatının 57 (%95) tanesinde *SAP1* ve 55 (%91,6) tanesinde *ALS1* geni saptandığı belirtilmiştir (AL-abidy vd., 2019).

Türkiye'de, Burdur ili'nde mastitisli inek sütlerinden identifiye edilen beş *C. albicans* izolatının birinde sadece *PLB1* geni, birinde sadece *ALS1* geni, ikisinde hem *PLB1* hem de *ALS1* genleri varlığı bildirilirken, bir izolatın da hiçbir gene sahip olmadığı rapor edilmiştir (Sav ve Öztürk, 2022).

Bu Tez çalışmasında, Anadolu mandalarından izole edilen iki *C. albicans* izolatında *ALS1*, *SAP1* ve *PLB1* genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. Türlerden ikisinin de *SAP1* genini taşıdığı belirlenirken, türlerde *ALS1* ve *PLB1* genleri bulunamadı. Elde

edilen bu sonucun, çalışmada izole edilen izolat sayısının azlığı ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Tez çalışmasının, Anadolu mandalarından izole edilen *C. albicans*'ın *SAP1* virülens geni varlığının tespit edildiği ilk rapor olması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, insan izolatlarında virülens ile ilişkili olduğu düşünülen bu genin, mastitis patogeneziindeki rolü hakkında yorum yapabilmek için daha fazla izolatla araştırma yapılması gerektiği düşünüldü.

Farklı ülkelerde *Candida* kaynaklı mastitislerden izole edilen türlerin antifungal ajanlara dirençlilikleri çeşitlilik göstermektedir. Milanov vd. (2014) Sırbistan'da süt ineklerinden izole ettikleri *Candida* türlerinin çeşitli antifungallere dirençliliklerini ticari antifungal test kiti kullanarak araştırmışlardır. Buna göre, araştırmacılar *C. krusei* izolatlarının tamamının flukonazole ve flusitozine, *C. rugosa* izolatlarının tamamının flusitozine ve *C. kefyr* izolatlarından birinin ise amfoterisin B'ye dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Mendes vd. (2017) tarafından Brezilya'da subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungal dirençlilikleri VITEK MS yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada izole edilen 32 izolatın %5,62'sinin flukonazole, %4,49'unun amfoterisin B'ye ve %2,25'inin vorikonazole dirençli olduğu belirtilirken, izolatlarda flusitozine karşı direnç belirlenmediği bildirilmiştir. Çin'de klinik mastitisli süt ineklerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungallere dirençliliklerinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve izole edilen 14 *C. krusei* izolatının tamamında fluorositozin, flukonazol, itrakonazol ve ketokonazole, ikisinde amfoterisin B'ye (%14,3), sekizinde ise nistatine (%57,1) direnç tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen altı *C. parapsilosis* izolatında fluorositozine %100, amfoterisin B'ye %33,3 ve itrakonazole %33,3 oranlarında direnç bulunduğu, izolatların tamamının ise flukonazol, nistatin ve ketokonazole duyarlı olduğu vurgulanmıştır (Du vd., 2018).

Türkiye'de de mastitisli hayvanlardan izole edilen *Candida* türlerine ilişkin antifungal direnç oranları farklılık göstermektedir. Hatay ili'nde yapılan bir Yüksek Lisans tezinde, süt ineklerinden izole edilen yedi izolatta antifungal direncin disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı ve izolatların tamamında flukonazole direnç tespit edildiği, ayrıca izolatlarda itrakonazol, ketokonazol, vorikonazol, amfoterisin B ve

flusitozine karşı da yüksek direnç oranları elde edildiği bildirilmiştir (Demir, 2016). Erbaş vd. (2017) tarafından yapılan ve antifungal direncin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılan bir araştırmada, izole edilen 46 *Candida* izolatının 42'sinde flusitozine ve 26'sında flukonazole direnç belirlendiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, *C. glabrata* (n=2) izolatlarının tamamında flusitozin, flukonazol ve ketokonazole, 12 *C. tropicalis* izolatının 10'unda flusitozine, sekiz *C. krusei* izolatının tamamında flusitozin ve flukonazole, altısında amfoterisin B'ye, altı *C. rugosa* izolatının tamamında flusitozin ve flukonazole, 10 *C. parapsilosis* izolatının tamamında flusitozin, sekizinde ise flukonazole direnç belirlendiği bildirilmiştir. Tekirdağ'da mastitisli ineklerden izole edilen *C. krusei*, *C. albicans*, *C. boidinii*, *C. famata*, *C. kefir*, *C. spherica* ve *C. thermophila* izolatlarının tamamında flukonazol, mikonazol, amfoterisin B ve flusitozine direnç, ketokonazole ise duyarlılık belirlendiği rapor edilmiştir (Sönmez ve Erbaş, 2017). Başka bir araştırmada, mastitisli süt örneklerinden elde edilen *C. krusei* (n=20), *C. albicans* (n=2) ve *C. tropicalis* (n=1) izolatlarının disk difüzyon yöntemi antifungal dirençlilik sonuçları tüm izolatlar için metronidazol ve flusitozine %100, *C. tropicalis* dışındaki izolatlar için ise flukonazol ve mikonazole %95 olarak verilmiştir (Yüksel Dolgun vd., 2022).

Bu Tez çalışmasında; Anadolu mandaları ve süt ineklerinden izole edilen *Candida* türlerinin antifungal dirençlilikleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Manda ve ineklerden elde edilen izolatların antifungallere dirençlilik açısından benzer profil sergilediği görüldü. Anadolu mandalarından izole edilen türlerin tamamında flusitozine direnç belirlenirken, türlerde itrakonazol (%98,9; n=92), amfoterisin B (%88,2; n=82), kaspofungin (%86; n=80) ve flukonazole (%83,9; n=78) karşı da yüksek direnç oranları elde edildi. Türlerin %90,3'ü (n=84) vorikonazole, %90,3'ü (n=84) ketokonazole duyarlıydı. Süt ineklerinden izole edilen 99 türün tamamı itrakonazol ve flusitozine dirençli iken, türlerin 96'sında (%97) amfoterisin B'ye, 75'inde (%75,8) kaspofungine ve 63'ünde flukonazole (%63,6) karşı direnç belirlendi. Bununla birlikte, türlerin 96'sının (%97) ketokonazole, 91'inin (%92) ise vorikonazole duyarlı oldukları tespit edildi. Tür bazında değerlendirildiğinde, hem manda hem de süt ineklerinden izole edilen; *C. krusei* izolatlarının tamamı flukonazole dirençliydi. *C. krusei*'nin flukonazole intrinsik direnç göstermesinin bu yüksek direnç oranını

açıklayabileceği düşünöldü. Genel olarak, *C. albicans* izolatlarında flusitozine karşı %10-30 arası bir dirençten bahsedilirken, son yıllarda NAC türlerinde flusitozine karşı artan bir direnç tespit edildiği vurgulanmaktadır (Sonmez ve Erbas, 2017; Yüksel Dolgun vd., 2022). Benzer şekilde bu çalışmada *C. albicans* da dahil olmak üzere, izole edilen tüm türlerde flusitozine karşı %100 direnç belirlendi. Yapılan araştırmalarda, mastitislerden izole edilen pek çok *Candida* türünün genellikle ketokonazole duyarlı olduğu ya da düşük düzeyde direnç gösterdiği bildirilmiştir (Sonmez ve Erbas, 2017; Du vd., 2018). Sunulan çalışmada da, türler bazında duyarlılığın en yüksek olduğu antifungal ajanların azol grubundan ketokonazol ve vorikonazol olması, bu antifungal ajanların örneklenen hayvanlar açısından en etkili antifungaller olduğu düşöndürdü. Konu ile ilgili araştırmacıların bulguları ile karşılaştırıldığında, direncin belirlendiği antifungaller açısından benzerlikler olduğu gibi, hem direnç oranları hem de direncin belirlendiği bazı antifungaller yönünden farklılıklar da vardı. Elde edilen bu farklılıklarda; izole edilen türlerin sayısı, türlerin ve orijinlerin farklılığı ile kullanılan yöntem farklılıklarının etkili olabileceği düşünöldü. Çalışmada, manda ve ineklerden izole edilen türlerin dirençli ya da duyarlı oldukları antifungal ajanlar çok değişmemekle birlikte, bakterilerde olduğu gibi tür identifikasyonu sonrası yapılacak antifungal duyarlılık testlerinin daha etkili olabileceği düşünöldü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu Tezde, Afyonkarahisar ili'nde ve ilçelerinde bulunan 39 farklı işletmeden örneklenen 301 Anadolu mandasına ait toplam 1188 meme lobu süt örneğinden 93 (%7,82) *Candida* izolatı, 14 farklı işletmedeki 332 sağmal ineğe ait toplam 1321 meme lobu süt örneğinden ise 99 (%7,49) *Candida* izolatı izole edildi. İlk kez bu çalışmada tasarlanan cins-spesifik primerler kullanılarak *Candida* cinsine ait oldukları doğrulanan toplam 192 izolata sekans analizi yapıldı. Sekans analizi sonuçlarına göre; mandalardan altı farklı tür, ineklerden beş farklı tür elde edilirken, hem mandalardan, hem de ineklerden en yüksek oranda identifiye edilen türler *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) ve *K. marxianus* (*C. kefyr*) olarak belirlendi. Böylece, örnekleme yapılan bölgede mastitis etiyolojisinde farklı *Candida* türlerinin rol oynayabileceği, ancak, ana *Candida* türlerinin non-*albicans* türler olduğu gösterildi. Anadolu mandaları ile süt ineklerinde *Candida* kaynaklı mastitis izolasyon oranlarının benzer bulunması, süt ineklerinde olduğu gibi, mandalarda da *Candida* kaynaklı mastitisin yaygın olabileceğini ve süt üretiminde önemli bir tehdit oluşturabileceğini düşündürdü. Çalışmada elde edilen izolasyon oranları; Mısır, Brezilya, Çin ve Türkiye'de yapılan bazı araştırmaların sonuçlarından daha düşük, Danimarka ve Japonya'dan bildirilen raporlara göre daha yüksek bulunurken, Yunanistan ve Polonya'ya ait verilerle ise benzerlik gösterdi. Elde edilen farklılıkta; örneklenen hayvan ve meme lobu sayıları, hayvanların mastitis durumları, coğrafik ve epidemiyolojik farklılıklar, türlerin orijini ve kullanılan izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin farklılığının etkili olabileceği düşünüldü.

Tezde kromojenik besiyeri olarak kullanılan CCA'nın *C. albicans* ve *C. glabrata* izolatlarını belirlemede, *C. krusei* ve *C. tropicalis* izolatlarını belirlemeden daha başarılı olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, besiyerinde üreyen koloni renklerinin, üretici firma bilgilendirmesinde yer alan renklerle tamamen uyumlu olmadığı görüldü. İnkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı gibi faktörlerin türlerin kromojenik agarlardaki pigmentasyon gelişimini etkileyebilmesi nedeniyle, mikolojik tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bu besiyerlerinde şüpheli olduğu belirlenen izolatların identifikasyonlarının biyokimyasal veya moleküler yöntemler kullanılarak desteklenmesinin önemli olabileceği düşünüldü.

Bu Tezde, Anadolu mandalarından iki *C. albicans* identifikasyonu gerçekleştirildi. Bu sayı, tahmin edilen *C. albicans* izolasyon oranından düşüktü. Çeşitli araştırmacılar, *C. albicans*'ın özellikle klinik ve/veya kronik mastitis saptanan meme loblarından daha sık izole edildiğini bildirmektedir. Bu çalışmada klinik ve/veya kronik mastitis bulguları gösteren hayvanlar bulunmamasının, düşük izolasyon oranını açıklayabileceği düşünüldü. Çalışmada Anadolu mandalarından identifiye edilen iki *C. albicans* izolatının virülens genlerinden *SAP1* genini taşıdığı belirlendi. Ancak, bu virülens geninin mastitis patogenezindeki etkisine ilişkin bir yorum yapabilmeyin, çalışmadaki izolat sayısı azlığı nedeniyle mümkün olmadığı düşünüldü.

Sunulan Tez çalışmasında, genel olarak, izolatlarda en yüksek direnç oranları flusitozin, itrakonazol, kaspofungin ve amfoterisin B'ye karşı iken, izolatlar üzerinde en etkili antifungaller ise vorikonazol ve ketokonazol olarak belirlendi. Günümüzde, antibiyotiklere karşı gelişen direncin sağlığı tehdit etmesi gibi, antifungallere karşı gelişen direncin de hem hayvan hem de halk sağlığını tehdit edebileceği düşünüldü. Özellikle son yıllarda azol grubu antifungal ajanlarda ortaya çıkan direnç insanlara kıyasla hayvanlarda daha yüksek oranda belirlenmektedir. Hayvanların dirençli etkenleri direnç genleri aracılığıyla çevreye bulaştırması sonucu, başta insanlar olmak üzere diğer evcil hayvanlar ve vahşi hayvanlar da etkilenebilmektedir. Bu nedenlerle antimikrobiyal ve antifungal direncin kontrolünde tek sağlık konseptinin önemi giderek artmaktadır. Halk sağlığı endişesi olan antimikrobiyal ve antifungal direnç gelişimini ve aşırı doz etken madde kullanımını önlemek amacıyla, tıpkı bakteriyel infeksiyonlarda olduğu gibi, *Candida* türlerine bağlı mastitislerde de tedaviye başlamadan önce antifungal duyarlılık testlerinin yapılmasının çok önemli olduğu bilinmektedir. Ancak, Veteriner Hekimlik sahasında kullanılan antifungal etken maddelerin sınırlı olması, kullanılmakta olan antifungal preparatların farmasötik etki şekillerine ilişkin verilerin yetersiz olması ve özellikle fungal mastitislerde meme içi preparatların sahada bulunamamasının, antifungal duyarlılık testleri ve antifungal tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde sınırlayıcı bir faktör olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, bu Tez çalışmasında örneklenen Anadolu mandaları ve süt ineklerinde mastitis patojeni olarak non-*albicans* türlerin daha yaygın olduğu gösterildi. Mikotik mastitislerden *Candida* türlerinin izolasyonuna yönelik yapılacak araştırmalar için, klasik kültür yöntemlerinin moleküler tekniklerle kombine edilmesinin tür düzeyinde identifikasyonda daha yararlı olabileceği düşünüldü. Tez çalışması, Türkiye'de Anadolu mandalarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler yöntemlerle tiplendirildiği ve manda orijinli *C. albicans* izolatlarında *SAP1* virülens geni varlığının gösterildiği ilk araştırma olması açısından önem taşımaktadır. Tezde elde edilen bu bulguların, daha sonra konu ile ilgili yapılacak araştırmalar için önemli epidemiyolojik veri kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Mikotik mastitislerin epidemiyolojilerine ilişkin araştırmalarda vurgulanan nonspesifik ve uzun süreli antibiyotik kullanımının mantarlarla ilişkili mastitis gelişiminde etkili olduğu dikkate alındığında, sahada Veteriner Hekim ve hayvan sahiplerinin bu konuda bilinçlendirilmesi gerektiği düşünüldü. Bunun yanı sıra, Veteriner sahada kullanılan antifungal etken maddelerin sınırlı olması ve özellikle fungal mastitislerde meme içi preparatların sahada bulunamaması, mikotik mastitislerin sağaltımını zorlaştıran faktörlerdendir. Bu Tez çalışmasında elde edilen sonuçların hem bölge hem de ülke hayvancılığı adına, Veteriner sahada *Candida* nedenli mastitis sağaltımı amacıyla kullanılabilecek meme içi preparatların geliştirilebilmesi açısından olanak sağlaması umut edilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aalbæk, B., Stenderup, J., Jensen, H.E., Valbak, J., Nylin, B., Huda, A. (1994). Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *Apmis*, 102(1-6): 451-456.
- Abacı, Ö., Haliki, A. (2004). *Candida albicans*'ın virulans faktörleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(9): 1-8.
- Abed, A. H., Menshawy, A. M. S., Zeinhom, M. M. A., Hossain, D., Khalifa, E., Wareth, G., Awad, M. F. (2021). Subclinical mastitis in selected bovine dairy herds in north upper Egypt: assessment of prevalence, causative bacterial pathogens, antimicrobial resistance and virulence-associated genes. *Microorganisms*, 9(6): 1175.
- Acharya, T., Hare, J. (2022). Sabouraud agar and other fungal growth media. In: Gupta, V.K., Tuohy, M. (eds) *Laboratory Protocols in Fungal Biology*, Springer, New York, NY.
- Adkins, P. R., Middleton, J. R. (2018). Methods for diagnosing mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 34(3): 479-491.
- Ahmed, R., Dar, F. A., Gojri, B. (2013). Present status, future road map and diagnosis of zoonotic mycotic diseases. *Biomed Pharmacol J*, 6(2): 467.
- Akdouche, L., Aissi, M., Zenia, S., Saadi, A. (2014). Importance of yeasts in the mammary infection of the cattle in the region of Sidi M'Hamed Ben Ali, Wilaya of Relizane, Algeria. *J Vet Sci Technol*, 5(2): 172.
- AL-Abedi, S.F. (2020). Comparative study for *Candida* spp. isolated and identification from goats milk with mastitis between API *Candida* chromogenic agar and VITEK 2 system. *Biochem Cell Arch*, 20(2,): 5329-5332.
- AL-abidy, H. F. H. A., Khudaier, B. Y., AL-Attaqchi, A. A. (2019). Conventional and molecular detection of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* isolated from bovine mastitis in Basrah-Iraq. *Biochem Cell Arch*, 19(2): 3285-3290.
- Alam, M. Z., Alam, Q., Jiman-Fatani, A., Kamal, M. A., Abuzenadah, A. M., Chaudhary, A. G., Haque, A. (2014). *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol*, 30: 1437-1451.
- Alhussien, M. N., Dang, A. K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet World*, 11(5): 562.
- Ali, T., Raziq, A., Wazir, I., Ullah, R., Shah, P., Ali, M. I., Liu, G. (2021). Prevalence of mastitis pathogens and antimicrobial susceptibility of isolates from cattle and buffaloes in Northwest of Pakistan. *Front Vet Sci*, 8: 746755.
- Anderson, F. M., Visser, N. D., Amses, K. R., Hodgins-Davis, A., Weber, A. M., Metzner, K. M., O'Meara, T. R. (2023). *Candida albicans* selection for human commensalism results in substantial within-host diversity without decreasing fitness for invasive disease. *PLOS Biol*, 21(5): e3001822.
- Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., Pitula, A. (2004). Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun*, 72(10): 6023-6031.
- Angeletti, S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*, 138: 20-29.
- Anil, S., Samaranayake, L. P. (2003). Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Chemotherapy*, 49(5): 243-247.
- Anwar, K. P., Malik, A., Subhan, K. H. (2012). Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol*, 4(4): 204.
- Aoki, W., Kitahara, N., Miura, N., Morisaka, H., Yamamoto, Y., Kuroda, K., Ueda, M. (2011). Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J Biochem*, 150(4): 431-438.

- Arafa, S. H., Elbanna, K., Osman, G. E., Abulreesh, H. H. (2023). *Candida* diagnostic techniques: a review. *Umm Al-Qura Univ Appl Sci*, 1-18.
- Arda, M. (2015). Temel Mikrobiyoloji, 5. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara
- Arda, M., İstanbulluoğlu, E. (1979). Mastitislere neden olan aerob, anaerob ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 26(3-4): 14-29.
- Argaw, A. (2016). Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. *Food Sci Qual Manag*, 52(6): 56-65.
- Ariton, A. M., Poroşnicu, I., Neculai-Văleanu, A. S., Crivei, I. C., Sănduleanu, C., Postolache, A. N., Trincă, L. C. (2022). Strategies for identifying and preventing fungal mastitis in dairy cows. *J Anim Sci Biotechnol*, 55(2): 104-104.
- Asan, A. (2007). Tıpta önemli mantarların filogenetik ve sistematigi. *İnf Derg*, 21(2): 21-31.
- Ashbee, H. R., Gilleece, M. H. (2014). Pharmacogenomics of Antifungal Agents. In *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
- Aubertine, C. L., Rivera, M., Rohan, S. M., Larone, D. H. (2006). Comparative study of the new colorimetric VITEK 2 yeast identification card versus the older fluorometric card and of CHROMagar *Candida* as a source medium with the new card. *J Clin Microbiol*, 44(1): 227-228.
- Awandkar, S. P., Kulkarni, M. B., Agnihotri, A. A., Chavan, V. G., Chincholkar, V. V. (2023). Novel fluconazole-resistant zoonotic yeast isolated from mastitis. *Anim Biotechnol*, 34(3): 746-755.
- Aydin, M., Kustimur, S., Kalkanci, A., Duran, T. (2019). Identification of medically important yeasts by sequence analysis of the internal transcribed spacer and D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Rev Iberoam Micol*, 36(3): 129-138.
- Azevedo, C., Pacheco, D., Soares, L., Romão, R., Moitoso, M., Maldonado, J., Simões, J. (2016). Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Trop Anim Health Prod*, 48: 451-459.
- Bac, N. D., Luc, N. K., Nga, T. T. T., Nagi, M., Yoshitsugu, M., Ha, H. T. T., Quyet, D. (2019). Prevalence of *Candida* bloodstream isolates from patients in two hospitals in Vietnam. *Iran J Microbiol*, 11(2): 108.
- Bakr, E.M., Abd-Tawab, A.M., Elshemey, T.M., Abd-elrhman, A.H. (2015). Diagnostic and therapeutic studies on mycotic mastitis in cattle. *Alex J Vet Sci*, 46(1): 138.
- Bansal, G., Narta, K., Teltumbade, M.R. (2018). Next-Generation Sequencing: Technology, Advancements, and Applications. In: Shanker, A. (eds) *Bioinformatics: Sequences, Structures, Phylogeny*. Springer, Singapore.
- Bari, M. S., Rahman, M. M., Persson, Y., Derks, M., Sayeed, M. A., Hossain, D., Koop, G. (2022). Subclinical mastitis in dairy cows in south-Asian countries: A review of risk factors and etiology to prioritize control measures. *Vet Res Commun*, 46(3): 621-640.
- Barker, K. S., Rogers, P. D. (2006). Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. *Curr Infect Dis Rep*, 8(6): 449-456.
- Baron, S., (1996). *Medical Microbiology*. 4thEd., The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- Barrett, A. W., Kingsmill, V. J., Speight, P. M. (1998). The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis*, 4(1): 26-31.
- Bastos, R. C., Alves, E. F., Neves, A. M., Vasconcelos, C. F. M., de Brito, E. H. S., dos Santos Fontenelle, R. O. (2023). Molecular diagnosis compared to conventional diagnosis for rapid detection of resistant strains of *Candida* spp. *Res Soc Dev*, 12(4): e14112441088.
- Bayona, J. V. M., García, C. S., Palop, N. T., Cardona, C. G. (2020). Evaluation of a novel chromogenic medium for *Candida* spp. identification and comparison with CHROMagar™ *Candida* for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 98(4): 115168.

- Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. (2014). Coagulase-negative *staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*, 27(4): 870-926.
- Becker, P., Normand, A. C., Vanantwerpen, G., Vanrobaeys, M., Haesendonck, R., Vercammen, F., Hendrickx, M. (2019). Identification of fungal isolates by MALDI-TOF mass spectrometry in veterinary practice: validation of a web application. *J Vet Diagn Invest*, 31(3): 471-474.
- Beena, M. S. (2020). Characterization and virulence of *Candida* isolated from children with dental caries and its susceptibility to various antimicrobial agents. In: *Dental Caries*. London: *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.91912
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., Nilsson, R. H. (2013). Improved software detection and extraction of *ITS1* and *ITS2* from ribosomal *ITS* sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol*, 4(10): 914-919.
- Benić, M., Maćešić, N., Cvetnić, L., Habrun, B., Cvetnić, Ž., Turk, R., Samardžija, M. (2018). Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control-a review. *Vet Arh*, 88(4): 535-557.
- Bertolini, A. B., Prado, A. M., Thyssen, P. J., de Souza Ribeiro Mioni, M., de Gouvea, F. L. R., da Silva Leite, D., Ribeiro, M. G. (2022). Prevalence of bovine mastitis-related pathogens, identified by mass spectrometry in flies (Insecta, Diptera) captured in the milking environment. *Lett Appl Microbiol*, 75(5): 1232-1245.
- Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Guix Vallverdú, R., Maldonado García, J., Sun, W., Cao, Z. (2016). Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *Plos one*, 11(5): e0155621.
- Blanco, J. L., Garcia, M. E. (2008). Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol*, 125(1-2): 47-70.
- Bonestroo, J., Fall, N., Hogeveen, H., Emanuelson, U., Klaas, I. C., van der Voort, M. (2023). The costs of chronic mastitis: A simulation study of an automatic milking system farm. *Prev Vet Med*, 210: 105799.
- Borman, A. M., Johnson, E. M. (2021). Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. *J Clin Microbiol*, 59(2): 10-1128.
- Botrel, M. A., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J. Y., Calavas, D. (2010). Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathog Dis*, 7(5): 479-487.
- Bougnoux, M. E., Dupont, C., Mateo, J., Saulnier, P., Faivre, V., Payen, D., Nicolas-Chanoine, M. H. (1999). Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol*, 37(4): 925-930.
- Bourtzi-Hatzopoulou, E., Zdragas, A., Petridou, E., Filiousis, G. (2003). Yeasts as a causative agent of bovine mastitis in Greece. *J Hell Vet Med Soc*, 54(2): 105-110.
- Bradford, K., Meinkoth, J., McKeirnen, K., Love, B. (2013). *Candida* peritonitis in dogs: report of 5 cases. *Vet Clin Pathol*, 42(2): 227-233.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J*, 164(2): 116-128.
- Bramono, K., Yamazaki, M., Tsuboi, R., Ogawa, H. (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Jpn J Infect Dis*, 59(2): 73.
- Bretagne, S., Costa, J. M. (2005). Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45(3): 361-368.
- Brinkman, F. S., Leipe, D. D. (2001). Phylogenetic analysis. *Methods of biochemical analysis*, New York, John Wiley & Sons, 43: 323-358.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247): 657-662.
- Butterfield, N. J. (2009). Modes of pre-Ediacaran multicellularity. *Precambrian Res*, 173(1-4): 201-211.

- Buurman, E. T., Westwater, C., Hube, B., Brown, A. J., Odds, F. C., Gow, N. A. (1998). Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci*, 95(13): 7670-7675.
- Cabañes, F. J. (2010). Yeast Pathogens of Domestic Animals. In: Ashbee, R., Bignell, E. (eds) *Pathogenic Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L., Gil, C. (2009). Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *J Proteomics*, 9(20): 4770-4786.
- Cabrera, E., González-Montelongo, R., Giraldez, T., de la Rosa, D. A., Siverio, J. M. (2014). Molecular components of nitrate and nitrite efflux in yeast. *Eukaryot Cell*, 13(2): 267-278.
- Calderone, R. A., Braun, P. C. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*, 55(1): 1-20.
- Calderone, R. A., Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(7): 327-335.
- Camp, I., Spettel, K., Willinger, B. (2020). Molecular methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *J Fungi*, 6(3): 101.
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. *BMC Vet Res*, 18(1): 1-16.
- Cao, H., Shockey, J. M. (2012). Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *J Agric Food Chem*, 60(50): 12296-12303.
- Carvalho, A., Costa-De-Oliveira, S., Martins, M. L., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Ludovico, P., Rodrigues, F. (2007). Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol*, 45(7): 619-627.
- Carvalho-Pereira, J., Fernandes, F., Araújo, R., Springer, J., Loeffler, J., Buitrago, M. J., Sampaio, P. (2020). Multiplex PCR based strategy for detection of fungal pathogen DNA in patients with suspected invasive fungal infections. *J Fungus*, 6(4): 308.
- Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R. J., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., Wear, M. P. (2019). The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, 10(1): 822-831.
- Casia dos Santos, R. D., Marin, J. M. (2005). Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, 159: 251-253.
- Cavalheiro, M., Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Front Med*, 5: 28.
- Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(3): 495-544.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1): 130-180.
- Chakrabarti, A., Sethuraman, N. (2017). Introduction to Medical Mycology. In: Mora-Montes, H., Lopes-Bezerra, L. (eds) *Current Progress in Medical Mycology*. Springer, s: 14.
- Charles, M. P., Kali, A., Joseph, N. M. (2015). Performance of chromogenic media for *Candida* in rapid presumptive identification of *Candida* species from clinical materials. *Pharmacognosy Res*, 7(1): 69.
- Chen, K. W., Lo, H. J., Lin, Y. H., Li, S. Y. (2005). Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol*, 54(3): 249-258.
- Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassoulilian-Barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., Cookson, B. T. (2001). Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol*, 39(11): 4042-4051.
- Cheng, W. N., Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments. A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(11): 1699.

- Cherry, J., Demmler-Harrison, G. J., Kaplan, S. L., Steinbach, W. J., Hotez, P. J. (2013). Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases, Elsevier Health Sciences.
- Chiou, C. C., Groll, A. H., Walsh, T. J. (2000). New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *Oncologist*, 5(2): 120-135.
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*, 33(4): 10-1128.
- Cilvez, P., Turkyilmaz, S. (2019). Molecular diagnosis of *Candida* species isolated from cases of subclinical bovine mastitis. *Isr J Vet Med*, 74(3): 134-140.
- CLSI. (2022). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cobirka, M., Tancin, V., Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. *J Anim*, 10(12): 2212.
- Cordeiro, R. D. A., Bittencourt, P. V., Brilhante, R. S. N., Teixeira, C. E. C., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., Silva, S. T. D. C., Rocha, M. F. G. (2013). Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. *Med Mycol*, 51(7): 731-736.
- Correia, A., Lermann, U., Teixeira, L., Cerca, F., Botelho, S., Gil da Costa, R. M., Pais, C. (2010). Limited role of secreted aspartyl proteinases *Sap1* to *Sap6* in *Candida albicans* virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun*, 78(11): 4839-4849.
- Costa, C. R., Marreto, L. C. N. L., Rocha, V. L., Silva, T. C. D., Silva, M. D. R. R. (2018). Biofilm forming capability and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. from blood. *Rev Patol Trop*, 47(1): 11-18.
- Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C., Pitangui, N. S., De Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J Fungus*, 3(2): 22.
- Cota, E., Hoyer, L. L. (2015). The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. *Future Microbiol*, 10(10): 1635-1548.
- Curto, M. Á., Butassi, E., Ribas, J. C., Svetaz, L. A., Cortés, J. C. (2021). Natural products targeting the synthesis of β (1, 3)-D-glucan and chitin of the fungal cell wall. Existing drugs and recent findings. *Phytomedicine*, 88: 153556.
- Da Costa, G. M., de Pádua Pereira, U., Souza-Dias, M. A. G., Da Silva, N. (2012). Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 49(3): 239-243.
- De Angelis, G., Menchinelli, G., Torelli, R., De Carolis, E., Posteraro, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B. (2020). Different detection capabilities by mycological media for *Candida* isolates from mono-or dual-species cultures. *Plos one*, 15(3): e0226467.
- De Vlieghe, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci*, 95(3): 1025-1040.
- De Vlieghe, S., Laevens, H., Devriese, L. A., Opsomer, G., Leroy, J. L. M., Barkema, H. W., de Kruif, A. (2003). Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Vet Microbiol*, 92(3): 245-252.
- De Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Grigoriev, I. V. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol*, 18: 1-45.
- Delavy, M., Dos Santos, A. R., Heiman, C. M., Coste, A. T. (2019). Investigating antifungal susceptibility in *Candida* species with MALDI-TOF MS-based assays. *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 19.

- Delma, F. Z., Al-Hatmi, A. M., Brüggemann, R. J., Melchers, W. J., de Hoog, S., Verweij, P. E., Buil, J. B. (2021). Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. *J Fungus*, 7(11): 909.
- Demir, M., 2016, Sığır, koyun ve keçilerde mikotik mastitislerin araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 61s, Hatay.
- Deorukhkar, S. C., Roushani, S. (2018). Identification of *Candida* species: conventional methods in the era of molecular diagnosis. *Ann Microbiol Immunol*, 1(1): 1002.
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., Mathew, S. (2014). Non-*albicans* *Candida* infection: an emerging threat. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 615958.
- Desai, J. V. (2018). *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. *J Fungus*, 4(1): 10.
- Devadas, S. M., Ballal, M., Prakash, P. Y., Hande, M. H., Bhat, G. V., Mohandas, V. (2017). Auxanographic carbohydrate assimilation method for large scale yeast identification. *J Clin Diagnostic Res*, 11(4): DC01-3.
- Devi, L. S., Maheshwari, M. (2014). Speciation of *Candida* species isolated from clinical specimens by using Chrom agar and conventional methods. *Int J Sci Res Publ*, 4(3):1-5.
- Dhiman, N., Hall, L., Wohlfel, S. L., Buckwalter, S. P., Wengenack, N. L. (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol*, 49(4): 1614-1616.
- DiazGranados, C. A., Martinez, A., Deaza, C., Valderrama, S. (2008). An outbreak of *Candida* spp. bloodstream infection in a tertiary care center in Bogotá, Colombia. *Braz J Infect Dis*, 12: 390-394.
- Dieser, S. A., Vissio, C., Lasagno, M. C., Bogni, C. I., Larriestra, A. J., Odierno, L. M. (2014). Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pak Vet J*, 34(1): 124-126.
- Diezmann, S., Cox, C. J., Schöni, G., Vilgalys, R. J., Mitchell, T. G. (2004). Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol*, 42(12): 5624-5635.
- DiNubile, M. J., Motyl, M., Sable, C. A. (2004). Caspofungin: the first licensed antifungal drug of the novel echinocandin class. *Clin Microbiol Newsl*, 26(11): 81-85.
- Doi, A. M., Pignatari, A. C. C., Edmond, M. B., Marra, A. R., Camargo, L. F. A., Siqueira, R. A. Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PloS one*, 11(1): e0146909.
- Domán, M., Makrai, L., Bányai, K. (2022). Molecular phylogenetic analysis of *Candida krusei*. *Mycopathologia*, 187(4): 333-343.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15(2): 167-193.
- dos Santos Nascimento, J., Fagundes, P. C., de Paiva Brito, M. A. V., Dos Santos, K. R. N., de Freire Bastos, M. D. C. (2005). Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 106(1-2): 61-71.
- Dos Santos, A. L. S. (2010). HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. *World J Biol Chem*, 1(2): 21.
- Drouhet, E. (2010). Historical Introduction: Evolution of Knowledge of the Fungi and Mycoses from Hippocrates to the Twenty-First Century. Topley and Wilson's Microbiology & Microbial Infections. Arnold London, UK, s: 1-20.
- Du, J., Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Liu, X., Zhou, X. (2018). Epidemiological investigation of non-*albicans* *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Vet Res*, 14(1): 1-9.
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J Vet Diagnostic Investig*, 27(6): 665-672.
- Dubie, T., Sisay, T., Gebru, M., Muktar, Y. (2015). An insight review on the role of fungi in mastitis of dairy animals and its economical importance. *J Vet Sci Phot*, 116: 440-445.

- Duchaussoy, A. C., Rose, A., Talbot, J. J., Barrs, V. R. (2015). Gastrointestinal granuloma due to *Candida albicans* in an immunocompetent cat. *Med Mycol Case Rep*, 10: 14-17.
- Dumitru, R., Hornby, J. M., Nickerson, K. W. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7): 2350-2354.
- Dupont, B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*, 49(1): 31-36.
- 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*, 196347.
- Dyer, P. S., Kück, U. (2017). Sex and the imperfect fungi. *Microbiol Spectr*, 5(3): 5-3.
- Eggimann, P., Garbino, J., Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*, 3(11): 685-702.
- Eghtedar Nejad, E., Ghasemi Nejad Almani, P., Mohammadi, M. A., Salari, S. (2020). Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal*, 34(10).
- Elad, D., Shpigel, N. Y., Winkler, M., Klinger, I., Fuchs, V., Saran, A., Faingold, D. (1995). Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 207(5): 620-622.
- El-Ashker, M., Gwida, M., Monecke, S., El-Gohary, F., Ehricht, R., Elsayed, M., Maurischat, S. (2020). Antimicrobial resistance pattern and virulence profile of *S. aureus* isolated from household cattle and buffalo with mastitis in Egypt. *Vet Microbiol*, 240: 108535.
- Eldesouky, I., Mohamed, N., Khalaf, D., Salama, A., Elsify, A., Ombarak, R., Shabrawy, A. (2016). *Candida* mastitis in dairy cattle with molecular detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22(3): 61-4.
- Erbaş, G., Parin, U., Kırkan, Ş., Savaşan, S., Özavcı, V., Yüksel, H. T. (2017). Identification of *Candida* strains with nested PCR in bovinemastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turkish J Vet Anim Sci*, 41(6): 757-763.
- Erdem, H., Erganiş, S., Evren, E., Aksakal, F. N., Çağlar, K., Kalkancı, A. (2017). Comparative analysis of different methods used for the identification of *Candida* on species level. *Turk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 47(3): 114-24.
- Evren, E., Göçmen, J. S., İştär, E. H., Yavuzdemir, Ş., Tekeli, F. A., Yavuz, Y., Karahan, Z. C. (2022). Medically important *Candida* spp. identification: An era beyond traditional methods. *Turk J Med Sci*, 52(3): 834-840.
- Fagiolo, A., Lai, O. (2007). Mastitis in buffalo. *Ital J Anim Sci*, 6(2): 200-206.
- Fatahinia, M., Halvaezadeh, M., Rezaei-Matehkolaei, A. (2017). Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Med Mycol J*, 27(2): 188-194.
- Feldmann, H. (2011). Yeast: Molecular and Cell Biology. John Wiley & Sons. Wiley-Blackwell: Weinheim, Germany, s: 464.
- Fernandes, J. A., Prandini, T. H., Castro, M. D. C. A., Arantes, T. D., Giacobino, J., Bagagli, E., Theodoro, R. C. (2016). Evolution and application of inteins in *Candida* species: a review. *Front Microbiol*, 7: 1585.
- Fidel Jr, P. L. (2002). Immunity to *Candida*. *Oral Dis*, 8: 69-75.
- Fidel Jr, P. L., Vazquez, J. A., Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 12(1): 80-96.
- Foongladda, S., Mongkol, N., Petlum, P., Chayakulkeeree, M. (2014). Multi-probe real-time PCR identification of four common *Candida* species in blood culture broth. *Mycopathologia*, 177: 251-261.
- Fox, L. K., Gay, J. M. (1993). Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9(3): 475-487.

- Francoz, D., Bergeron, L., Nadeau, M., Beauchamp, G. (2012). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Québec. *Can Vet J*, 53(10): 1071.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F., Ghannoum, M. A. (1997). Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, 143(2): 331-340.
- Gale, C. A., Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science*, 279(5355): 1355-1358.
- Garcia, M. J., Rios, G., Ali, R., Bellés, J. M., Serrano, R. (1997). Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143(4): 125-1131.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., Trevijano-Contador, N. (2020). The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Front Microbiol*, 10: 2993.
- Garibyan, L., Avashia, N. (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, 133(3): e6.
- Gelberg H. B. (2017). Alimentary System and the Peritoneum, Omentum, Mesentery, and Peritoneal Cavity. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6^{ed}. St. Louis Missouri, Elsevier, s: 324-411.
- Gelgelu, M. G., Abebe, T. K., Mulugeta, W. (2023). Prevalence of bovine mastitis, associated risk factors and major bacterial causes in and around Sagure Town, Arsi Zone, Oromia, Ethiopia. *J Reprod Infertil*, 14(1): 01-09.
- Getahun, Y. A., Abey, S. L., Beyene, A. M., Belete, M. A., Tessema, T. S. (2023). Coagulase-negative *Staphylococci* from bovine milk: Virulent gene detection, and antibiogram profiles. Preprint (1) available at research square (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3029527/v1>).
- Gezgen, C., Seker, E. (2016). Investigation of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Acta Sci Vet*, 44: 1-9.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, 13(1): 122-143.
- Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., Campa, M. (2008). Efficacy of chromogenic *candida* agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*, 14(2): 141-147.
- Gokce, G., Cerikcioglu, N., Yagci, A. (2007). Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, 164(6): 265-9.
- Goncagül, G., Günaydın, E., Lisuzzo, A., Fiore, E., Çokal, Y., Zeybek, M. (2023). Do CMT, SCC, and bacteriological isolation overlap in subclinical mastitis cases of Anatolian buffaloes?. *J Etlik Vet Microbiol*, 34(1): 1-10.
- Gorbalenya, A. E., Lauber, C. (2017). Phylogeny of viruses. *Ref Module Biomed Sci*, B978-B970.
- Gorthi, L.V. (2019). Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). Ed: Turgut, M., Challa, S., Akhaddar, A., In: Fungal Infections of the Central Nervous System. Springer.
- Gökalp, A. B. (2021). Sığır mastitislerinde yaz mastitisinin yeri. *Bozok Vet Sci*, 2(2): 85-95.
- Green, M. R., Sambrook, J. (2019). Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*, (6): pdb-top095109.
- Grover, N. D. (2010). Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian J Pharmacol*, 42(1): 9-11.
- Guimarães, J. L., Brito, M. A., Lange, C. C., Silva, M. R., Ribeiro, J. B., Mendonça, L. C., Souza, G. N. (2017). Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a holstein dairy herd under tropical conditions. *Prev Vet Med*, 142: 46-50.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect*, 20: 5-10.

- Guiver, M., Levi, K., Oppenheim, B. A. (2001). Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol*, 54(5): 362-366.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *J Cytol*, 36(2): 116-117.
- Gupta, N., Verma, V. K. (2019). Next-generation sequencing and its application: empowering in public health beyond reality. *Microbial technology for the welfare of society*. Springer Nature, Singapore, p: 313-341.
- Gülmez, D., Alp, Ş. (2021). Mantar infeksiyonlarının laboratuvar tanısında klasik yöntemler ve yeni gelişmeler. *Flora J Infect Dis Clin Microbiol*, 26(1): 34-49.
- Hamadani, H., Khan, A. A., Bandy, M. T., Ashraf, I., Handoo, N., Bashir, A., Hamadani, A. (2013). Bovine mastitis-A disease of serious concern for dairy farmers. *Int J Livest Res*, 3(1): 42-55.
- Hare, J. M. (2013). Sabouraud Agar for Fungal Growth. Eds: Gupta, V., Tuohy, M., Ayyachamy, M., Turner, K., O'Donovan, A., In: *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Springer, New York, NY.
- Harmal, N. S., Khodavandi, A., Alshawsh, M. A., Jamal, F., Sekawi, Z., Peng, N. K., Chong, P. P. (2013). Identification and differentiation of *Candida* species using specific polymerase chain reaction (PCR) amplification of the phospholipase B gene. *Afr J Microbiol Res*, 7(20): 2159-66.
- Harpf, V., Rambach, G., Würzner, R., Lass-Flörl, C., Speth, C. (2020). *Candida* and complement: New aspects in an old battle. *Front immunol*, 11: 1471.
- Harris, M., Mora-Montes, H. M., Gow, N. A., Coote, P. J. (2009). Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology*, 155(4): 1058-1070.
- Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., Fries, B. C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect*, 11(8-9): 753-761.
- Hassan, A. E., Mohamed, A. A., El-Khalek, A., Hanaa, M., Elhamaky, A. (2023). Zinc oxide nanoparticles and curcumin affect some virulence genes of *Staphylococcus aureus* and *Candida*, the cause of subclinical mastitis in buffalo. *Egypt J Agric Res*, 101(1): 95-109.
- Hayashi, T., Sugita, T., Hata, E., Katsuda, K., Zhang, E., Kiku, Y., Kawai, K. (2013). Molecular-based identification of yeasts isolated from bovine clinical mastitis in Japan. *J Vet Med Sci*, 75(3): 387-390.
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*, 9(12): 591-596.
- Hazen, K. C., Howell, S. A. (2003). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeast of medical importance, Eds: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th. Washington: ASM Press, p: 1693-1712.
- Heinz, W. J., Kurzai, O., Brakhage, A. A., Fonzi, W. A., Korting, H. C., Frosch, M., Mühlischlegel, F. A. (2000). Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol*, 290(3): 231-238.
- Hernandez, S., López-Ribot, J. L., Najvar, L. K., McCarthy, D. I., Bocanegra, R., Graybill, J. R. (2004). Caspofungin resistance in *Candida albicans*: correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4): 1382-1383.
- Hernday, A. D., Noble, S. M., Mitrovich, Q. M., Johnson, A. D. (2010). Genetics and molecular biology in *Candida albicans*. *Methods Enzymol*, 470: 737-758.
- Hilmioğlu-Polat, S., Seyedmousavi, S., Ilkit, M., Hedayati, M. T., Inci, R., Tumbay, E., Denning, D. W. (2019). Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses*, 62(1): 22-31.
- Hirota, K., Yumoto, H., Sapaar, B., Matsuo, T., Ichikawa, T., Miyake, Y. (2017). Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*, 122(2): 321-330.

- Hirschhorn, J. W., Schandl, C. A., Nolte, F. S. (2022). Polymerase chain reaction and other nucleic acid amplification technology. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Ed: McPherson, R.A., Pincus, M.R., Elsevier, USA, p: 1387-1400.
- Hizlisoy, H., Ertas Onmaz, N., Al, S., Karadal, F., Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Dinc, G. (2020). Clonal diversity and antifungal susceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mljekarstvo*, 70(1): 40-49.
- Hoang, M. T. V., Irinyi, L., Chen, S. C., Sorrell, T. C., ISHAM Barcoding of Medical Fungi Working Group, Meyer, W. (2019). Dual DNA barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections. *Front Microbiol*, 10: 1647.
- Hoehamer, C. F., Cummings, E. D., Hilliard, G. M., Rogers, P. D. (2010). Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(5): 1655-1664.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Zimmerli, C. E. E. W. (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect*, 21: 1-25.
- Holm, C., Jespersen, L. (2003). A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 69(5): 2857-2863.
- Horisawa, S., Sakuma, Y., Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. *J Wood Sci*, 59: 432-441.
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., Webster, K. M. (2009). Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*, 48(12): 1695-1703.
- Hospenthal, D. R., Beckius, M. L., Floyd, K. L., Horvath, L. L., Murray, C. K. (2006). Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5(1): 1-5.
- Hoyer, L. L. (2001a). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9(4): 176-180.
- Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Arnold, J. (2001b). Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics*, 157(4): 1555-1567.
- Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S. H., Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family a sticky pursuit. *Med Mycol*, 46(1): 1-15.
- Hube, B., Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 147(8): 1997-2005.
- Hull, C. M., Johnson, A. D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, 285(5431): 1271-1275.
- Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., Ghannoum, M. A. (1995). Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 63(5): 1993-1998.
- Ibrahim, M., Hussein, A., Salem, R. M. (2019). Real time PCR for identification of viable but non culturable fungi isolated from mastitic cattle milk samples depending on propidium mono azide stain. *Vet Res*, 1(2): 112-118.
- Inci, M., Atalay, M. A., Özer, B., Evirgen, Ö., Duran, N., Motor, V. K., Durmaz, S. (2013). Investigations of *ALS1* and *HWP1* genes in clinical isolates of *Candida albicans*. *Turkish J Med Sci*, 43(1):125-130.
- Ishii, Y., Ito, Y., Matsuki, S., Sanpei, K., Ogawa, O., Takeda, K., Uemura, N. (2018). Clinical drug-drug interaction potential of BFE1224, prodrug of antifungal ravuconazole, using two types of cocktails in healthy subjects. *Clin Transl Sci*, 11(5): 477-486.
- Jain, N., Hasan, F., Fries, B. C. (2008). Phenotypic switching in fungi. *Curr Fungal Infect*

Rep, 2: 180-188.

- Jan, A., Bashir, G., Altaf, I., Fomda, B. A., Hamid, S., Jan, K. (2022). Evaluation of various phenotypic methods for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Microbiol Methods*, 193: 106400.
- Jasm Mohammed, S., Yassein, S. N. (2020). Characterization of some virulence factors of *Candida albicans* isolated from subclinical bovine mastitis. *Plant Arch*, 20: 238-242.
- Javed, S., Muhammad, G., Saqib, M., Hussain, I. (2015). Comparative prevalence of streak canal and intramammary microorganisms and their contemporaneous association in a dairy cow and buffalo herd lacking mastitis control program. *Int J Agric Biol*, 17(4).
- Jesse, F. F. A., Bitrus, A. A., Peter, I. D., Chung, E. L. T., Tukiran, N. (2023). Clinical and subclinical mastitis in ruminants: A review of etiological agents, diagnosis, clinical management, and risk factors. *Res Vet Sci*, 1(2): 51-65.
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., Fulde, M. (2021). The role of *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. *Microorganisms*, 9(7): 1497.
- Kaczorek, E., Małaczewska, J., Wójcik, R., Siwicki, A. K. (2017). Biofilm production and other virulence factors in *Streptococcus* spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. *BMC Vet Res*, 13(1): 1-7.
- Kaczorek-Łukowska, E., Małaczewska, J., Wójcik, R., Naumowicz, K., Blank, A., Siwicki, A. K. (2021). *Streptococci* as the new dominant aetiological factors of mastitis in dairy cows in north-eastern Poland: analysis of the results obtained in 2013-2019. *Ir Vet J*, 74: 1-6.
- Kadosh, D., Mundodi, V. (2020). A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. *J Fungus*, 6(1): 13.
- Kagan, S., Ickowicz, D., Shmuel, M., Altschuler, Y., Sionov, E., Pitusi, M., Polacheck, I. (2012). Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(11): 5603-5611.
- Kamai, Y., Kubota, M., Kamai, Y., Hosokawa, T., Fukuoka, T., Filler, S. G. (2002). Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun*, 70(9): 5256-5258.
- Kansaen, R., Boueroy, P., Hatrongjit, R., Kamjumphol, W., Kerdsin, A., Chopjitt, P. (2023). The occurrence and characteristics of methicillin-resistant staphylococcal isolates from foods and containers. *Antibiotics*, 12(8): 1287.
- Kaur, G., Bansal, B. K., Singh, R. S., Kashyap, N., Sharma, S. (2018). Associations of teat morphometric parameters and subclinical mastitis in riverine buffaloes. *J Dairy Res*, 85(3): 303-308.
- Khalaf, D. D., Soliman, M. M. H., Mansour, A. S. (2021). Conventional and molecular identification of mycotic mastitis caused by *Candida* in farm animals. *Int J Vet Sci*, 10(1): 64-68.
- Khan, Z. U., Mustafa, A. S. (2001). Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res*, 156(1): 95-102.
- Khasapane, N. G., Byaruhanga, C., Thekisoe, O., Nkhebenyane, S. J., Khumalo, Z. T. (2023). Prevalence of subclinical mastitis, its associated bacterial isolates and risk factors among cattle in Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Vet Res*, 19(1): 123.
- Kidd, S. E., Abdolrasouli, A., Hagen, F. (2023). Fungal nomenclature: Managing change is the name of the game. *Open Forum Infect Dis*, 10(1): ofac559.
- Kidd, S., Halliday, C., Ellis, D. (2022). Descriptions of Medical Fungi, 4th Edition, CABI.
- Kim, D., Shin, W. S., Lee, K. H., Kim, K., Young Park, J., Koh, C. M. (2002). Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39 °C. *Yeast*, 19(11): 957-962.
- Klaas, I. C., Zadoks, R. N. (2018). An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transbound Emerg Dis*, 65: 166-185.

- Klis, F. M., Groot, P. D., Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol*, 39(1): 1-8.
- Kofla, G., Ruhnke, M. (2011). Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis-review of the literature. *Eur J Med Res*, 16(4): 159-166.
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*, 8: 108.
- Krauke, Y., Sychrova, H. (2010). Four pathogenic *Candida* species differ in salt tolerance. *Curr Microbiol*, 61(4): 335-9.
- Krishnaswamy, S., Vedanayagam, A. R., Varma, K. (1965). Studies on mastitis in cattle. *Indian Vet J*, 42: 92-103.
- Kristanc, L., Božič, B., Jokhadar, Š. Z., Dolenc, M. S., Gomišček, G. (2019). The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. *Biochim Biophys Acta Biomembrs*, 1861(2): 418-430.
- Krukowski, H., Lassa, H.E., Zastempowska, E., Smulski, S.E., Bis-Wencel, H. (2020). Etiological agents of bovine mastitis in Poland. *Med Weter*, 76: 221-225.
- Krukowski, H., Saba, L. (2003). Bovine mycotic mastitis. *Folia Vet*, 47(1): 3-7.
- Ksouri, S., Djebir, S., Hadeif, Y., Benakhla, A. (2015). Survey of bovine mycotic mastitis in different mammary gland statuses in two north-eastern regions of Algeria. *Mycopathologia*, 179(3-4): 327-331.
- Kulkarni, A. G., Kaliwal, B. B. (2013). Bovine mastitis: a review. *Int J Recent Sci Res*, 4(5): 543-548.
- Kumar, R., Thakur, A., Sharma, A. (2023). Comparative prevalence assessment of subclinical mastitis in two crossbred dairy cow herds using the California mastitis test. *J Dairy Vet Anim Res*, 12(2): 98-102.
- Kumar, S., Kumar, A., Roudbary, M., Mohammadi, R., Černáková, L., Rodrigues, C. F. (2022). Overview on the infections related to rare *Candida* species. *Pathogens*, 11(9): 963.
- Kurt, S., Ekşi, F. (2021). Pathogen isolation and antibiogram analysis in dairy cows with clinical mastitis in Adana region, Turkey. *J Etlik Vet Microbiol*, 32(1): 20-26.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol*, 35(5): 1216-1223.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-371.
- Kvaal, C., Lachke, S. A., Srikantha, T., Daniels, K., McCoy, J., Soll, D. R. (1999). Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun*, 67(12): 6652-6662.
- Lacroix, C., Gicquel, A., Sendid, B., Meyer, J., Accoceberry, I., François, N., Bougnoux, M. E. (2014). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*, 20(2): 153-158.
- Lamichhane, K., Adhikari, N., Bastola, A., Devkota, L., Bhandari, P., Dhungel, B., Ghimire, P. (2020). Biofilm-producing *Candida* species causing oropharyngeal candidiasis in HIV patients attending Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital in Kathmandu, Nepal. *HIV/AIDS Res Palliat Care*, 211-220.
- Laniado-Laborín, R., Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*, 26(4): 223-227.
- Larson, J. L., Wallace, T. L., Tyl, R. W., Marr, M. C., Myers, C. B., Cossum, P. A. (2000). The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran®(liposomal nystatin) in rats and rabbits. *Toxicol Sci*, 53(2): 421-429.
- Leach, M. D., Tyc, K. M., Brown, A. J., Klipp, E. (2012). Modelling the regulation of thermal

- adaptation in *Candida albicans*, a major fungal pathogen of humans. *PLoS One*, 7(3): 1-14.
- Leaw, S. N., Chang, H. C., Barton, R., Bouchara, J. P., Chang, T. C. (2007). Identification of medically important *Candida* and non-*candida* yeast species by an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*, 45(7): 2220-2229.
- Leaw, S. N., Chang, H. C., Sun, H. F., Barton, R., Bouchara, J. P., Chang, T. C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol*, 44(3): 693-699.
- Ledbetter, E. C., Irby, N. L., Kim, S. G. (2011). *In vivo* confocal microscopy of equine fungal keratitis. *Vet Ophthalmol*, 14(1): 1-9.
- Lemaitre, M., Cousty, S., Marty, M. (2018). Chair-side direct microscopy procedure for diagnosis of oral candidiasis in an adolescent. *Case Rep Dent*, 1-4.
- Lerm, B., Kenyon, C., Schwartz, I. S., Kroukamp, H., de Witt, R., Govender, N. P., Botha, A. (2017). First report of urease activity in the novel systemic fungal pathogen *Emergomyces africanus*: a comparison with the neurotrope *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res*, 17(7): 1-10.
- Levinson, W (2014). Review of Medical Microbiology and Immunology. 13th Ed., McGraw Lange Medical Book, USA.
- Li, D., Yi, J., Han, G., Qiao, L. (2022). MALDI-TOF mass spectrometry in clinical analysis and research. *ACS Meas Sci Au*, 2(5): 385-404.
- Lilic, D. (2002). New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Infect Dis*, 15(2): 143-147.
- Lim, S. J., Mohamad Ali, M. S., Sabri, S., Muhd Noor, N. D., Salleh, A. B., Oslan, S. N. (2021). Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. *Med Mycol*, 59(12): 1127-1144.
- Limon, J. J., Skalski, J. H., Underhill, D. M. (2017). Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe*, 22(2): 156-165.
- Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J bacteriol*, 180(15): 3735-3740.
- Long, E. O., Dawid, I. B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem*, 49(1): 727-764.
- Lopes, J. P., Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1): 89-121.
- Lopez, J., Dalle, F., Mantelin, P., Moiroux, P., Nierlich, A. C., Pacot, A., Bonnin, A. (2001). Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using rosco diagnostic tablets. *J Clin Microbiol*, 39(3): 1172-1174.
- Lundberg, Å., Nyman, A. K., Aspán, A., Börjesson, S., Unnerstad, H. E., Waller, K. P. (2016). Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *J Dairy Sci*, 99(3): 2102-2117.
- Luo, G., Mitchell, T. G. (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40(8): 2860-2865.
- MacCallum, D. M. (2012). Hosting infection: Experimental models to assay *Candida* virulence. *Int J Microbiol*, 363764.
- Macias-Paz, I. U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J. P., Guerra-Cárdenas, J. E., Reyna-Beltrán, E. (2022). *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol*, 55(2): 189-198.
- Madhavan, P., Jamal, F., Chong, P. P. (2011). Laboratory isolation and identification of *Candida* species. *J Appl Sci*, 11(16): 2870-2877.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çeviren: Çökmüş, C., Palme Yayıncılık, Ankara.

- Magalhães, J., Correia, M. J., Silva, R. M., Esteves, A. C., Alves, A., Duarte, A. S. (2022). Molecular techniques and target selection for the identification of *Candida* spp. in oral samples. *Appl Sci*, 12(18): 9204.
- Magro, G., Biffani, S., Minozzi, G., Ehricht, R., Monecke, S., Luini, M., Piccinini, R. (2017). Virulence genes of *S. aureus* from dairy cow mastitis and contagiousness risk. *Toxins*, 9(6): 195.
- Magro, S., Visentin, E., Chiarin, E., Cendron, F., Penasa, M., Costa, A., De Marchi, M. (2023). Pathogen detection via quantitative PCR in milk of healthy cows collected using different sampling protocols. *Pathogens*, 12(7): 935.
- Maheshwari, M., Kaur, R., Chadha, S. (2016). *Candida* species prevalence profile in HIV seropositive patients from a major tertiary care hospital in New Delhi, India. *J Pathog*, 6204804.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8): 1142.
- Malinová, Z., Čonková, E., Váczi, P. (2023). Biofilm formation in medically important *Candida* species. *J Fungi*, 9(10): 955.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. (2013). Clinical Veterinary Microbiology, e-book, Elsevier Health Sciences, Edinburgh.
- Martin, K. J., Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiol*, 5(1): 1-11.
- Martin, R., Albrecht-Eckardt, D., Brunke, S., Hube, B., Hünninger, K., Kurzai, O. (2013). A core filamentation response network in *Candida albicans* is restricted to eight genes. *PLoS one*, 8(3): e58613.
- Martínez, J. P., Gil, M. L., López-Ribot, J. L., Chaffin, W. L. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1): 121-141.
- Martinez, L. R., Fries, B. C. (2010). Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Curr Fungal Infect Rep*, 4: 266-275.
- Mayer, F. L., Wilson, D., Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2): 119-128.
- Mazu, T.K., Bricker, B.A., Flores-Rozas, H., Ablordeppey, S.Y. (2016). The mechanistic targets of antifungal agents: an overview. *Mini Rev Med Chem*, 16: 555-578
- Mba, I. E., Nweze, E. I. (2019). Antifungal resistance profile and enzymatic activity of *Candida* species recovered from human and animal samples. *Bio-Research*, 17(1): 1044-1055.
- Mbindyo, C. M., Gitao, G. C., Mulei, C. M. (2020). Prevalence, etiology, and risk factors of mastitis in dairy cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Vet Med Int*, 8831172.
- Mendes, J. F., Gonçalves, C. L., Ferreira, G. F. D., Esteves, I. A., Freitas, C. H. D., Villarreal, J. P. V., Nascente, P. D. S. (2017). Antifungal susceptibility profile of different yeasts isolates from wild animals, cow's milk with subclinical mastitis and hospital environment. *Brazilian J Biol*, 78(1): 68-75.
- Menu, E., Landier, J., Prudent, E., Ranque, S., L'ollivier, C. (2021). Evaluation of 11 DNA automated extraction protocols for the detection of the 5 main *Candida* species from artificially spiked blood. *J Fungi*, 7(3): 228.
- Messeir, I., Abrantes, P., Africa, C.W. (2012). Strengths and limitations of different chromogenic media for the identification of *Candida* species. *J Microbiol Res*, 2(5): 133-40.
- Miao, Y., Ding, T., Liu, Y., Zhou, X., Du, J. (2023). The yeast and hypha phases of *Candida krusei* induce the apoptosis of bovine mammary epithelial cells via distinct signaling pathways. *Animals*, 13(20): 3222.
- Miceli, M. H., Díaz, J. A., Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*, 11(2): 142-151.
- Milanov, D., Prunic, B. O., Velhner, M. A., Bojkovski, J. (2014). Diagnosis of yeast mastitis in dairy cows. *Lucr Științ Ser Med Vet*, 47(1): 56-64.
- Miller, M. G., Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled

- by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3): 293-302.
- Mitchell, A. P. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6): 687-692.
- Mohamed, H. A., Elbarbary, H. A., Awad, D. A. B., Nazmy, S. (2022). Isolation and identification of fungi from subclinical mastitic milk. *Benha Vet Med J*, 42(2): 138-142.
- Money, N. P., (2016). Chapter 2 - Fungal cell biology and development, Eds: Watkinson, S. C., Boddy, L., Money, N. P., In: *The Fungi*, 3th. Academic Press, Boston, p:37-66.
- Montes, K., Ortiz, B., Galindo, C., Figueroa, I., Braham, S., Fontecha, G. (2019). Identification of *Candida* species from clinical samples in a Honduran tertiary hospital. *Pathogens*, 8(4): 237.
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Vet Anim Sci*, 100306.
- Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Castillo, L., Brand, A., Buurman, E. T., Gow, N. A. (2010). A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J Biol Chem*, 285(16): 12087-12095.
- Mora-Montes, H. M., Lopes-Bezerra, L. M. (2017). Current Progress in Medical Mycology. Springer International Publishing, Switzerland, p: 1-425
- Moran, G. P., Coleman, D. C., Sullivan, D. J. (2012). *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: why is *C. albicans* more pathogenic?. *Int J Microbiol*, 205921.
- Moreira, M. A., Silva Júnior, A., Lima, M. C. Costa, S. L. (2019). Infectious Diseases in Dairy Cattle. In *Raw Milk*. Cambridge: Academic Press, p: 235-258.
- Moroni, P., Daryl, N., Paula, O., Jessica, S., Paul, V., Rick, W., Amy, Y. (2018). Diseases of the Teats and Udder. In: *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p: 389-465.
- Moroni, P., Rossi, C. S., Pisoni, G., Bronzo, V., Castiglioni, B., Boettcher, P. J. (2006). Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *J Dairy Sci*, 89(3): 998-1003.
- Morschhäuser, J. (2010). Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol*, 199: 165-172.
- Moshref, B. S. E. 2004, Studies on microbial causes of mastitis in buffaloes. Cairo Üniversitesi, Doktora Tezi, Mısır.
- Moudgal, V., Little, T., Boikov, D., Vazquez, J. A. (2005). Multiechinocandin-and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(2): 767-769.
- Mousa, W., Elmonir, W., Abdeen, E. (2016). Molecular typing, virulence genes and potential public health implications of *Candida albicans* isolated from bovine milk. *Jpn J Vet Res*, 64(2): 211-215.
- Mroczyńska, M., Brillowska-Dąbrowska, A. (2021). Virulence of clinical *Candida* isolates. *Pathogens*, 10(4): 466.
- Mugale, M., Bhat, A. A., Gavhane, D. S., Bhat, S. A. (2015). Outbreaks of thrush in pigeons in Punjab State of India. *Comp Clin Path*, 24(3): 635-638.
- Mukherjee, J., Das, P. K., Banerjee, D. (2023). Lactation Physiology. Eds: Das, P. K., Sejian, V., Mukherjee, J., Banerjee, D., In: *Textbook of Veterinary Physiology*, Springer, Singapore.
- Mukherjee, P. K., Seshan, K. R., Leidich, S. D., Chandra, J., Cole, G. T., Ghannoum, M. A. (2001). Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology*, 147(9): 2585-2597.
- Munjal, G., Hanmandlu, M., Srivastava, S. (2019). Phylogenetics Algorithms and Applications. Eds: Hu, Y. C., Tiwari, S., Mishra, K., Trivedi, M., In: *Ambient Communications and*

- Computer Systems, Advances in Intelligent Systems and Computing, Springer, Singapore.
- Munro, C. A., Bates, S., Buurman, E. T., Hughes, H. B., MacCallum, D. M., Bertram, G., Gow, N. A. (2005). Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant α -1, 2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem*, 280(2): 1051-1060.
- Murray, M. P., Zinchuk, R., Larone, D. H. (2005). CHROMagar *Candida* as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid-assimilation-of-trehalose test. *J Clin Microbiol*, 43(3): 1210-1212.
- Mühlschlegel, F. A., Fonzi, W. A. (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol*, 17(10): 5960-7.
- Nabili, M., Ashrafi, M., Janbabaie, G., Hedayati, M. T., Ali-Moghaddam, K., Shokohi, T. (2013). Quantification and optimization of *Candida albicans* DNA in blood samples using Real-Time PCR. *Rep Biochem Mol Biol*, 2(1): 42.
- Nadăş, G. C., Kalmár, Z., Taulescu, M. A., Chirilă, F., Bouari, C. M., Răpunţean, S., Fiţ, N. I. (2014). Comparative identification of *Candida* species isolated from animals using phenotypic and PCR-RFLP methods. *J Vet Res*, 58(2): 219-222.
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol*, 67(3): 400-428.
- Naglik, J. R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., Hube, B. (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, 154(11): 3266-80.
- Nakazawa, T., Takahashi, M., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (2000). Cloning and characterization of EPD2, a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64(2): 369-377.
- Nami, S., Aghebati-Maleki, A., Morovati, H., Aghebati-Maleki, L. (2019). Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Biomed Pharmacother*, 110: 857-868.
- Naranjo-Ortiz, M. A., Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol Rev*, 94(6): 2101-2137.
- Navarro, F. J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machín, F., Guillén, R. M., Siverio, J. M. (2003). The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res*, 4(2): 149-155.
- Nehdi, A., Samman, N., Aguilar-Sánchez, V., Farah, A., Yurdusev, E., Boudjelal, M., Perreault, J. (2020). Novel strategies to optimize the amplification of single-stranded DNA. *Front Bioeng Biotechnol*, 8: 401.
- Nemcova, E., Cernochova, M., Ruzicka, F., Malisova, B., Freiburger, T., Nemec, P. (2015). Rapid identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. *PLoS One*, 10(2): 1-15.
- Neppelenbroek, K. H., Seó, R. S., Urban, V. M., Silva, S., Dovigo, L. N., Jorge, J. H., Campanha, N. H. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*, 20(4): 329-344.
- Nobile, C. J., Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*, 69: 71-92.
- Noumi, E., Snoussi, M., Noumi, I., Saghrouni, F., Aouni, M., Valentin, E. (2015). Phenotypic characterization and adhesive properties of vaginal *Candida* spp. strains provided by the CHU Farhat Hached (Sousse, Tunisia). *Rev Iberoam Micol*, 32(3): 170-179.
- Novak, A., Vágvolgyi, C., Pesti, M. (2003). Characterization of *Candida albicans* colony-morphology mutants and their hybrids. *Folia Microbiol*, 48: 203-209.
- Odds, F. C. (1991). Sabouraud ('s) agar. *Med Mycol*, 29(6): 355-359.
- Odds, F. C., Bernaerts, R. I. A. (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation

- medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*, 32(8): 1923-1929.
- Odds, F. C., Brown, A. J., Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 11(6): 272-279.
- Oh, S. H., Smith, B., Miller, A. N., Staker, B., Fields, C., Hernandez, A., Hoyer, L. L. (2019). Agglutinin-like sequence (ALS) genes in the *Candida parapsilosis* species complex: blurring the boundaries between gene families that encode cell-wall proteins. *Front Microbiol*, 10: 781.
- Omara, S. T. (2017). MIC and MBC of honey and gold nanoparticles against methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin-resistant (VRSA) coagulase-positive *S. aureus* isolated from contagious bovine clinical mastitis. *J Genet Eng Biotechnol*, 15(1): 219-230.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3): 775-818.
- Osorio, C., Fletcher, O., Dykstra, M. J., Post, K., John Barnes, H. (2007). Comb candidiasis affecting roosters in a broiler breeder flock. *Avian Dis*, 51(2): 618-622.
- Özenç, E., Şeker, E., Yılmaz, M. (2019). Abattoir-Based survey of mastitis in cattle in Afyonkarahisar Province. *Kocatepe Vet J*, 12(4):1-442.
- Özenç, E., Vural, M. R., Şeker, E., Uçar, M. (2008). An evaluation of subclinical mastitis during lactation in Anatolian buffaloes. *Turkish J Vet Anim Sci*, 32(5): 359-368.
- Ozenc, E., Bozkurt, M. F., Yazici, E., Seker, E., Bayraktaroglu, A. G., Ozcinar, U., Dogan, N. (2020). Teat characteristics in relation to animal temperament during milking in buffaloes, and comparison of buffalo and cow teat morphology. *Reprod Domest Anim*, 55(5): 559-566.
- Özgüven, V. (2019). MediTUS Mikrobiyoloji. Klinisyen Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Özyurtlu, N. (2011). İneklerde mastitisin ekonomik ve sağlık açısından önemi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, (1): 36-38.
- Padilha, C. M. L., Picciani, B. L. S., Santos, B. M. D., Silva Júnior, A., Dias, E. P. (2014). Comparative analysis of Gram's method and PAS for the identification of *Candida* spp. samples from the oral mucosa. *J Bras Patol Med Lab*, 50: 352-358.
- Pal, M. (2015). Growing role of fungi in mycotic abortion of domestic animal. *J Bacteriol Mycol*, 2(1): 1009.
- Parmeland, L., Gazon, M., Guerin, C., Argaud, L., Lehot, J. J., Bastien, O. (2013). *Candida albicans* and non-*candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol*, 51(1): 33-37.
- Perlin, D. S. (2015). Echinocandin resistance in *Candida*. *Clin Infect Dis*, 61(6): 612-617.
- Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C., Rotstein, C., Azie, N. E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the prospective antifungal therapy (PATH) registry 2004-2008. *PloS one*, 9(7): e101510.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Ling, T. A. (2010). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*, 48(4): 1366-1377.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., Jones, R. N. (2019). Twenty years of the sentry antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997-2016. In: Open forum infectious diseases, Oxford University Press, USA, p: 79-94.
- Pfaller, M. A., Houston, A., Coffmann, S. (1996). Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*, 34(1): 58-61.
- Pincus, D. H., Orenga, S., Chatellier, S. (2007). Yeast identification; past, present, and future

- methods. *Med Mycol*, 45(2): 97-121.
- Pirrone, A., Castagnetti, C., Mariella, J., Bonoli, C., Stancampiano, L., Tampieri, M. P., Galuppi, R. (2012). Yeast flora in oropharyngeal and rectal mucous membranes of healthy and critically ill neonatal foals. *J Equine Vet Sci*, 32(2): 93-98.
- Pisanu, S., Cacciotto, C., Pagnozzi, D., Puggioni, G. M. G., Uzzau, S., Ciaramella, P., Addis, M. F. (2019). Proteomic changes in the milk of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with subclinical mastitis due to intramammary infection by *Staphylococcus aureus* and by non-*aureus* staphylococci. *Sci Rep*, 9(1): 15850.
- Pohlman, L. M., Chengappa, M. M. (2022). Yeasts: *Cryptococcus*, *Malassezia* and *Candida*. *Vet Microbiol*, 405-417.
- Prasad, R. (2017). *Candida albicans*: Cellular and Molecular Biology. Springer International Publishing, Switzerland.
- Preis, I. S., Silva, R. O., Pires, P. S., Lobato, F. C., Palhares, M. S., Maranhão, R. P., Ecco, R. (2012). Enteritis associated with *Clostridium difficile* and opportunistic candidiasis in a foal. *Brazilian J Vet Pathol*, 5(1): 7-11.
- Pristov, K. E., Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 25(7): 792-798.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Ir Vet J*, 62: 1-5.
- Qin, Y., Zhang, L., Xu, Z., Zhang, J., Jiang, Y. Y., Cao, Y., Yan, T. (2016). Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*, 7(5): 512-526.
- Quinn P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Hartigan, P., Fanning, S., Fitzpatrick, E. (2011). *Veterinary Microbiology And Microbial Disease*. 2nd ed., John Wiley & Sons, United State, p: 413-483.
- Radzikowski, D., Kalińska, A., Kot, M., Jaworski, S., Wierzbicki, M., Gołębiewski, M. (2023). *In vitro* evaluation of the antimicrobial properties of nanoparticles as new agents used in teat sealants for mastitis prevention in dry cows. *Biomedicines*, 11(8): 2291.
- Raheel, I. A. E. R., Hassan, W. H., Salam, H. S. H., Abed, A. H., Salem, S. S. R. (2023). Recovery rate of fungal pathogens isolated from cases of bovine and ovine mycotic mastitis. *J Vet Res*, doi:10.21608/JVMR.2023.190262.1082.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod*, 80(3): 756-770.
- Raju, S.B., Rajappa, S. (2011). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Int Sch Res Notices*, 487921.
- Ramage, G., Martínez, J. P., López-Ribot, J. L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6(7): 979-986.
- Rapala-Kozik, M., Surowiec, M., Juszczak, M., Wronowska, E., Kulig, K., Bednarek, A., Kozik, A. (2023). Living together: The role of *Candida albicans* in the formation of polymicrobial biofilms in the oral cavity. *Yeast*. 40(8): 303-317.
- Reiss, T. (2001). Drug discovery of the future: the implications of the human genome project. *Trends Biotechnol*, 19(12): 496-499.
- Rişvanlı, A., Kalkan, C. (2002). Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 13(1-2): 84-87.
- Rodríguez, D., Almirante, B., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., Mensa, J., Ayats, J. (2010). Predictors of candidaemia caused by non-*albicans* *Candida* species: results of a population-based surveillance in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect*, 16(11): 1676-1682.
- Rodríguez-Cerdeira, C., Martínez-Herrera, E., Carnero-Gregorio, M., López-Barcenas, A., Fabbrocini, G., Fida, M., González-Cespón, J. L. (2020). Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis. *Front Microbiol*, 11: 544480.

- Rossoni, R. D., Barbosa, J. O., Vilela, S. F. G., Santos, J. D. D., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C. (2013). Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with *in vivo* pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Braz J Oral Sci*, 12: 199-204.
- Rusu, E., Radu-Popescu, M., Pelinescu, D., Vassu, T. (2014). Treatment with some anti-inflammatory drugs reduces germ tube formation in *Candida albicans* strains. *Braz J Microbiol*, 45: 1379-1383.
- Sabo, J. A., Abdel-Rahman, S. M. (2000). Voriconazole: a new triazole antifungal. *Ann Pharmacother*, 34(9): 1032-1043.
- Sachivkina, N., Podoprigora, I., Bokov, D. (2021). Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Vet World*, 14(6): 1608.
- Saghrouni, F. B. A. J., Ben Abdeljelil, J., Boukadida, J., Ben Said, M. (2013). Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review. *J Appl Microbiol*, 114(6): 1559-1574.
- Sahoo, A. K., Mahajan, R. (2016). Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian J Dermatol*, 7(2): 77.
- Saijo, S., Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*, 23(8): 467-472.
- Samanta, I. (2015). *Veterinary Mycology*, Springer New Delhi, India.
- Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P. (2001). Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*, 14(2): 398-429.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Shuman, H.A. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA, p: 3520.
- Sampedro, A., Mendiola, J. C., Martínez, L. A. (2018). MALDI-TOF Commercial Platforms for Bacterial Identification. In: *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Academic Press. Elsevier, p: 47-57.
- Sancak, B., Colakoglu, S., Acikgoz, Z. C., Arikan, S. (2005). Incubation at room temperature may be an independent factor that induces chlamydospore production in *Candida dubliniensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 52(4): 305-309.
- Sanford, C. J., Keefe, G. P., Sanchez, J., Dingwell, R. T., Barkema, H. W., Leslie, K. E., Dohoo, I. R. (2006). Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prev Vet Med*, 77(1-2): 96-108.
- Sant, D. G., Tupe, S. G., Ramana, C. V., Deshpande, M. V. (2016). Fungal cell membrane, promising drug target for antifungal therapy. *J Appl Microbiol*, 121(6): 1498-1510.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol*, 15(2): 601-613.
- Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J., Lim, G. H. (2001). Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *J Dairy Sci*, 84(9): 2018-2024.
- Sarıçam, S., Müştak, H. K. (2015). Filogenetik ağaçlandırma metotları. *J Etlik Vet Microbiol*, 26(2): 58-64.
- Sarma, O., Hussain, J. (2021). Bovine Mastitis: An Overview. *Vigyan Varta*, 2: 54-59.
- Sartori, L. C. A., Santos, R. C., Marin, J. M. (2014). Identification of *Candida* species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 66(5): 1615-1617.
- Sasse, C., Hasenberg, M., Weyler, M., Gunzer, M., Morschhäuser, J. (2013). White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion. *Eukaryot Cell*, 12(1): 50-58.
- Satala, D., Karkowska-Kuleta, J., Zelazna, A., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. (2020). Moonlighting proteins at the candidal cell surface. *Microorganisms*, 8: 1046.
- Satılmış, Ö. K., Akkaya, Y., Ergin, Ç., Kaleli, İ. (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* spp. kökenlerinde slime faktör üretimi. *Pam Med J*, 4(1): 25-29.

- Satué, K., Gardon, J. C. (2016). Infection and Infertility in Mares. InTech. doi: 10.5772/63741.
- Sav, O., Öztürk, D. (2022). Determination of virulence factors in *Candida albicans* isolated from cattle with mastitis. *Maku J Health Sci Inst*, 10(1): 91-99.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6): 365-377.
- Schalm, O.W., Carroll, E.J., Jain, N.C. (1971). Bovine Mastitis. Lea&Febiger, Philadelphia, p: 136-157.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, baaa062.
- Seker, E., Dogan, Y. N. (2023). First report of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from water buffalo clotted cream in Turkey: First report of VR *E. faecalis* and *E. faecium* from buffalo clotted cream. *J Hellenic Vet Med Soc*, 74(3): 6107-6116.
- Seker, E., Ozenc, E., Turedi, O. K., Yilmaz, M. (2023). Prevalence of *mecA* and *pvl* genes in coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms in Turkey. *Anim Biotechnol*, 34(7): 2427-2432.
- Selvarangan, R., Bui, U., Limaye, A. P., Cookson, B. T. (2003). Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*, 41(12): 5660-5664.
- Seneviratne, C. J., Jin, L., Samaranayake, L. P. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: A mini review. *Oral Dis*, 14(7): 582-590.
- Serhan, G., Stack, C. M., Perrone, G. G., Morton, C. O. (2014). The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 13(1): 18-21.
- Seyedmousavi, S., Bosco, S. D. M., De Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med Mycol*, 56(1): 165-187.
- Shaheen, M., Tantary, H. A., Nabi, S. U. (2016). A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. *J Adv Dairy Res*, 4(1): 1-10.
- Shahid, M., Hussain, R., Nawaz, Z., Aslam, B., Ahmad, M. Z., Siddique, A. B., Shami, A. (2023). Occurrence of virulence genes among methicillin-resistant *staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *ACS Omega*, 8(41): 38111-38117.
- Sharkey, L. L., McNemar, M. D., Saporito-Irwin, S. M., Sypherd, P. S., Fonzi, W. A. (1999). *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol*, 181(17): 5273-5279.
- Sharma, A., Chhabra, R., Sindhu, N. (2012). Prevalence of sub clinical mastitis in cows: its etiology and antibiogram. *Indian J Anim Res*, 46(4): 348-353.
- Sharma, A., Chhabra, R., Singh, M., Charaya, G. (2018). Prevalence, etiology and antibiogram of bacterial isolates recovered from mastitis of buffaloes. *Buffalo Bull*, 37(3): 313-320.
- Sharma, N., Singh, N. K., Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australas J Anim Sci*, 24(3): 429-438.
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yatoo, M., Patel, S. K., Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet Q*, 41(1): 107-136.
- Shepherd, M. G., Yin, C. Y., Ram, S. P., Sullivan, P. A. (1980). Germ tube induction in *Candida albicans*. *Can J Microbiol*, 26(1): 21-26.
- Shiferaw, J., Telila, I. (2017). Prevalence of bovine mastitis and assessment of risk factors in and around Wolayta Sodo, Ethiopia. *Int J Homeopath Nat Med*, 2(1): 1-7.

- Shimada, K., Tachibana, M., Watamura, T., Kobayashi, H., Matsumoto, A., Iwanaga, M., Shibahara, T. (2021). Swine abortion caused by *Candida parapsilosis*. *J Vet Med Sci*, 83(11): 1666-1669.
- Shoaib, M., Aqib, A. I., Naseer, M. A., Bhutta, Z. A., Wanxia, P. U., Tanveer, Q., Hammad, M. (2021). Etiology of bovine mastitis. In mastitis in dairy cattle, sheep and goats. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.98543
- Shoham, S., Levitz, S. M. (2005). The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*, 129(5): 569-582.
- Shourie, A., Singh, R., Singh, A. (2021). Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections of Lab Animals. Eds: Gupta, A., Pratap Singh, N., In: *Fungal Diseases in Animals.*, Fungal Biology. Springer, Switzerland, p:73-91.
- Shrief, R., Zaki, M. E. S., El-Sehsah, E. M., Ghaleb, S., Mofreh, M. (2019). Study of antifungal susceptibility, virulence genes and biofilm formation in *Candida albicans*. *Open Microbiol J*, 13(1): 241-248.
- Sienkiewicz, B. M., Łapiński, Ł., Wiela-Hojeńska, A. (2016). Comparison of clinical pharmacology of voriconazole and posaconazole. *Wspolczesna Onkol*, 20(5): 365-373.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 36(2): 288-305.
- Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms antifungal resistance. *J Fungi*, 3(1): 8.
- Silva-Dias, A., Miranda, I. M., Branco, J., Monteiro-Soares, M., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*, 6: 205.
- Silva-Graça, M., Neves, L., Lucas, C. (2003). Outlines for the definition of halotolerance/halophily in yeasts: *Candida versatilis* (halophila) CBS4019 as the archetype?. *FEMS Yeast Res*, 3(4): 347-362.
- Silveira-Gomes, F., Sarmiento, D. N., Espírito-Santo, E. P. T. D., Souza, N. D. O., Pinto, T. M., Marques-da-Silva, S. H. (2011). Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using hypertonic Sabouraud broth and tobacco agar. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44(4): 457-460.
- Singh, D. P., Verma, R. K., Sarswat, S., Saraswat, S. (2021). Non-*Candida albicans* *Candida* species: virulence factors and species identification in India. *Cur Med Mycol*, 7(2): 8.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 6: 791.
- Siverio, J. M. (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol Rev*, 26(3): 277-284.
- Slutsky, B., Staebell, M., Anderson, J., Risen, L., Pfaller, M. T., Soll, D. R. (1987). "White-opaque transition": A second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 169(1): 189-197.
- Smistad, M., Bakka, H. C., Sølverød, L., Jørgensen, H. J., Wolff, C. (2023). Prevalence of udder pathogens in milk samples from Norwegian dairy cows recorded in a national database in 2019 and 2020. *Acta Vet Scand*, 65(1): 19.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973) *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. WF Freeman & Co, San Francisco, p: 573.
- Sokół, I., Tokarzewski, S., Bobrek, K., Gawel, A. (2020). E-test determination of antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from turkeys. *J Vet Res*, 64(4): 517.
- Soliman, M. M., Kandil, M. M., Sa, E., Abuelnaga, A. S. (2020). Prevalence of virulence genes and antifungal resistance in *candida albicans* isolated from raw goat milk. *World Vet J*, 10(4): 670-677.
- Soll, D. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *J Oral Microbiol*, 6(1): 22993.

- Sonmez, M., Erbas, G. (2017). Isolation and identification of *Candida* spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. *Int J Vet Sci*, 6(2): 104-107.
- Sousa, F., Nascimento, C., Ferreira, D., Reis, S., Costa, P. (2023). Reviving the interest in the versatile drug nystatin: a multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent. *Adv Drug Deliv Rev*, 114969.
- Spampinato, C., Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*, 204237.
- Staab, J. F., Ferrer, C. A., Sundstrom, P. (1996). Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 271(11): 6298-6305.
- Staib, P., Morschhäuser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1): 1-12.
- Stefanetti, V., Marenzoni, M. L., Lepri, E., Coletti, M., Proietti, P. C., Agnetti, F., Passamonti, F. (2014). A case of *Candida guilliermondii* abortion in an Arab mare. *Med Mycol Case Rep*, 4: 19-22.
- Steinberg, G., Peñalva, M. A., Riquelme, M., Wösten, H. A., Harris, S. D. (2017). Cell biology of hyphal growth. *Microbiol Spectr*, 5(2): 10-1128.
- Stockman, L., Roberts, G. (1985). Rapid screening method for the identification of *C. glabrata*, Abstracts of the 85th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington, D. C. ASM. p: 377.
- Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*, 9(10): 737-748.
- Sudbery, P., Gow, N., Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 12(7): 317-324.
- Sullivan, D. J., Moran, G., Donnelly, S., Gee, S., Pinjon, E., McCartan, B., Coleman, D. C. (1999). *Candida dubliniensis*: An update. *Rev Iberoam Micol*, 16(2): 72-76.
- Sun, L., Liao, K., Wang, D. (2015). Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PloS one*, 10(2): e0117695.
- Szymański, M., Chmielewska, S., Czyżewska, U., Malinowska, M., Tylicki, A. (2022). Echinocandins-structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 37(1): 876-894.
- Şahin, A., Yıldırım, A. (2015). Mandalarda mastitis olgusu. *Turkish J Agric-Food Sci Technol*, 3(1): 1-8.
- Şeker, E. (2010). Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their *in vitro* hemolytic activity in Western Turkey. *Mycopathologia*, 169(4): 303-308.
- Şeker, E., Özenç, E. (2011). *In vitro* biofilm activity of *Candida* species isolated from Anatolian buffaloes with mastitis in Western Turkey. *Vet Arh*, 81(6): 723-730.
- Taei, M., Chadehanipour, M., Mohammadi, R. (2019). An alarming rise of non-albicans *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Res Notes*, 12: 1-7.
- Takahashi, H., Ueda, K., Itano, E. N., Yanagisawa, M., Murata, Y., Murata, M., Uchida, S. (2010). *Candida albicans* and *C. tropicalis* isolates from the expired breaths of captive dolphins and their environments in an aquarium. *Vet Med Int*, 349364.
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., Škrlec, I. (2021). *Candida albicans*, the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J Fungi*, 7(2): 79.
- Talazadeh, F., Ghorbanpoor, M., Shahriyari, A. (2022). Candidiasis in birds (Galliformes, Anseriformes, Psittaciformes, Passeriformes, and Columbiformes): A focus on antifungal susceptibility pattern of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates in avian clinical specimens. *Top Companion Anim Med*, 46: 100598.
- Tamo, S. B. (2020). *Candida* infections: clinical features, diagnosis and treatment. *Infect Dis Clin Microbiol*, 2: 91-103.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci*, 101(30): 11030-11035.

- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7): 3022-3027.
- Tan, S., Tan, H. T., Chung, M. C. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, 8(19): 3924-3932.
- Taverna, C. G., Bosco-Borgeat, M. E., Murisengo, O. A., Davel, G., Boité, M. C., Cupolillo, E., Canteros, C. E. (2013). Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108: 178-185.
- Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C. Y., Nichterlein, T., Köhler, G. A. (2006). Inactivation of the phospholipase B gene *PLB5* in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol*, 296(6): 405-420.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*, 10(9): 1173-1182.
- Tommasoni, C., Fiore, E., Lisuzzo, A., Ganesella, M. (2023). Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. *Animals*, 13(15): 2538.
- Tong, S. Y., Giffard, P. M. (2012). Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *J Clin Microbiol*, 50(11): 3418-3421.
- Toxqui-Munguia, M., Avila-Sosa, R., Castaneda-Roldan, E., Duarte-Escalante, E., Castaneda-Antonio, D., Leon-Tello, G., Munguia-Perez, R. (2022). Antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from the milk of dairy cattle presenting with subclinical mastitis in Puebla, Mexico. *J Pure Appl Microbiol*, 16(3): 1878-83.
- Trtkova, J., Raclavsky, V. (2006). Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150(1): 51-61.
- Tsuboi, R., Komatsuzaki, H., Ogawa, H. (1996). Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun*, 64(8): 2936-2940.
- Turhan, V. (2009). Tennessee (ABD)'den Türkiye'ye histoplazmozun öyküsü. *Mikrobiyol Bul*, 43: 339-351.
- Turner, S. A., Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect*, 4(9).
- Tuzcu, N., Hadimli, H. H., Padron, B. (2023). Determination of virulence genes and antibiotic resistance profiles of *Streptococcus agalactiae* isolated from buffalo milk. *Turkish J Vet Anim Sci*, 47(4): 356-364.
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2022). Çiğ süt üretim istatistikleri. Erişim adresi: [http://www.tuik.gov.tr]. Erişim tarihi: 15.07.2023
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) (2023). Hayvansal üretim istatistikleri. Erişim adresi: [http://www.tuik.gov.tr]. Erişim tarihi: 20.11.2023
- Tümbay, E. (1999). *Candida* türleri, In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed: Ustaçelebi, Ş., Güneş Kitabevi, Ankara, s: 1081-1086.
- Türedi, O. K., Şeker, E. (2023). Mikrobiyolojide en yaygın moleküler tanı yöntemi: polimeraz zincir reaksiyonu. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 12(1): 118-125.
- Türkyılmaz, S., Kaynarca, S. (2011). The slime production by yeasts isolated from subclinical mastitic cows. *Acta Vet Brno*, 79(4): 581-586.
- Umar, A., Whong, C. M. Z., Abdullahi, I. O., Usman, M. (2023). Bacteriological quality of fresh cow milk from dairy farms in Parts of Kaduna State, Nigeria. *Int Internal Med J*, 1(5): 214-223.
- Valand, N., Girija, U. V. (2021). *Candida* pathogenicity and interplay with the immune system. *Adv Exp Med Biol*, 1313: 241-272.
- Vale-Silva, L. A., Moeckli, B., Torelli, R., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Sanglard, D. (2016). Upregulation of the adhesin gene *EPA1* mediated by *PDR1* in *Candida glabrata* leads to enhanced host colonization. *Mosphere*, 1(2): 10-1128.
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., Souza, P. R. E. D., Carvalho, A. D. A.

- T., Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian J Microbiol*, 40(1): 1-11.
- Van Der Meer, J. W., Van de Veerdonk, F. L., Joosten, L. A., Kullberg, B. J., Netea, M. G. (2010). Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity. *Int J Antimicrob Agents*, 36: 58-62.
- Van Der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, 59(2): 304-322.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*, 1-26.
- Vanderhaeghen, W., Cerpentier, T., Adriaensen, C., Vicca, J., Hermans, K., Butaye, P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol*, 144(1-2): 166-171.
- Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: a disease of opportunity. *J Fungi*, 6(1): 15.
- Vural, R., Ergün, Y., Özenç, E. (2016). Büyük Ruminantlarda Mastitis. In: Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Eds: Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. *Medipres Matbaacılık*. s:149-259.
- Vylkova, S., Carman, A. J., Danhof, H. A., Collette, J. R., Zhou, H., Lorenz, M. C. (2011). The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio*, 2(3): 10-1128.
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. Ed: M. Schaechter, In: Desk Encyclopedia Of Microbiology, 2nd ed., Elsevier, p: 1174-1187.
- Walsh, T. J., Hayden, R. T., Larone, D. H. (2018). Larone's medically important fungi: A guide to identification. 6th ed. Washington, DC, ASM Press, p: 15-72, 73-331.
- Wang, M., Tian, J., Xiang, M., Liu, X. (2017). Living strategy of cold-adapted fungi with the reference to several representative species. *Mycology*, 8(3): 178-188.
- Wawron, W., Bochniarz, M., Piech, T. (2010). Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 54(2): 201-204.
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Front Microbiol*, 7: 1-12.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315-322.
- Whiteway, M., Bachewich, C. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*, 61: 529-553.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(3): 965-974.
- Willems, N., Houwers, D. J., Schlotter, Y. M., Theelen, B., Boekhout, T. (2017). Disseminated candidiasis in a young, previously healthy, dog and review of literature. *Mycopathologia*, 182: 591-596.
- Xiao, M., Fan, X., Chen, S. C. A., Wang, H., Sun, Z. Y., Liao, K., Xu, Y. C. (2015). Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *J Antimicrob Chemother*, 70(3): 802-810.
- Yağcı, I. P. (2008). Subclinical mastitis in sheeps: Etiology, epidemiology and diagnosis methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 14(1): 117-22.
- Yakan, A. H., Şeker, E. (2022). Investigation of methicillin and panton-valentine leukocidin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clotted creams sold in afyonkarahisar. *Kocatepe Vet J*, 15(1): 101-105.

- Yamaguchi, H. (2016). Potential of ravuconazole and its prodrugs as the new oral therapeutics for onychomycosis. *Med Mycol*, 57(4): 93-110.
- Yang, F. L., Li, X. S., Yang, B. Z., Zhang, Y., Zhang, X. F., Qin, G. S., Liang, X. W. (2012). Clinical mastitis from calving to next conception negatively affected reproductive performance of dairy cows in Nanning, China. *African J Biotechnol*, 11(10): 2574-2580.
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (*ITS*), specifically *ITS1* and *ITS2*, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PloS one*, 13(10): e0206428.
- Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*, 36(4): 223-228.
- Yilmaz, M., Şeker, E. (2022). Investigation of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms. *J Etlik Vet Microbiol*, 33(1): 50-55.
- Yiş, R., Doluca, M. (2018). Identification of *Candida* species by restriction enzyme analysis. *Turkish J Med Sci*, 48(5): 1058-1067.
- Yücel, A. (1999). Medical mycology: yesterday and today. *Cerrahpasa J Med*, 30(2): 191-198.
- Yücel, A., Kantarcıoğlu, A. S. (2000). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Cerrahpaşa J Med*, 31(3): 172-86.
- Yüksel Dolgun, H. T., Kırkan, Ş. Özavcı, V. (2022). Investigation of the efficacy and antifungal drug resistance of non-*albicans* *Candida* species in mycotic mastitis. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 11(1): 113-119.
- Zaragoza, C. S., Olivares, R. A. C., Watty, A. E. D., de la Peña Moctezuma, A., Tanaca, L. V. (2011). Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Rev Iberoam Micol*, 28(2): 79-82.
- Zecconi, A., dell'Orco, F., Rizzi, N., Vairani, D., Cipolla, M., Pozzi, P., Zanini, L. (2020). Cross-sectional study on the prevalence of contagious pathogens in bulk tank milk and their effects on somatic cell counts and milk yield. *Ital J Anim Sci*, 19(1): 66-74.
- Zhang, J., Hung, G. C., Nagamine, K., Li, B., Tsai, S., Lo, S. C. (2016). Development of *Candida*-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiol Insights*, 9: MBI-38517.
- Zhao, X., Oh, S. H., Cheng, G., Green, C. B., Nuessen, J. A., Yeater, K., Hoyer, L. L. (2004). ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology*, 150(7): 2415-2428.
- Zhao, X., Oh, S. H., Yeater, K. M., Hoyer, L. L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology*, 151(5):1619-1630.
- Zhou, Y., Ren, Y., Fan, C., Shao, H., Zhang, Z., Mao, W., Cui, Y. (2013). Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop Anim Health Prod*, 45: 1709-1714.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 69(4): 317-325.
- Zlotowski, P., Rozza, D. B., Pescador, C. A., Barcellos, D. E., Ferreira, L., Sanches, E. M., Driemeier, D. (2006). Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet J*, 171(3): 566-569.