

## GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLARIN POTANSİYEL RİSK FAKTÖRLERİ

Didem Akpınar Kankaya\*, Banu Özden Tuncer, Yasin Tuncer

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş tarihi / *Received*: 25.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 09.06.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 10.06.2016

### Özet

Enterokoklar insan ve hayvan sindirim sisteminin yanı sıra çevresel kaynaklardan da izole edilebilen laktik asit bakterileridir (LAB). Enterokoklar farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olmalarının yanında ekstrem tuz konsantrasyonunda da gelişebilme yeteneklerinden dolayı fermente gıdalardan yüksek sıklıkla izole edilirler. Enterokoklar sahip oldukları çeşitli teknolojik özellikleri sayesinde geleneksel fermente gıdaların tipik tat ve aromasının geliştirilmesinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmakta ayrıca ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına da katkı sağlamaktadırlar. Çeşitli yararlı özelliklere sahip olmalarına rağmen enterokoklar, artan antibiyotik direnci, çeşitli hastalıklara sebep olan virülens faktörlere sahip olmaları, biyofilm ve biyojen amin üretme özellikleri nedeniyle insan sağlığı açısından ciddi risk oluşturmaktadırlar. Bu derlemede enterokokların antibiyotik direnç mekanizmaları, çeşitli virülens faktörleri ile biyofilm ve biyojen amin üretme özellikleri irdelenmeye çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Enterokok, antibiyotik direnci, virülens faktör, biyofilm, biyojen amin

## POTENTIAL RISK FACTORS OF FOOD ORIGINATED ENTEROCOCCI

### Abstract

Enterococci are lactic acid bacteria (LAB), isolated from human and animal digestive tract in addition environmental sources. Enterococci are often isolated from fermented foods because of resistant to different temperature and pH and also ability of growing at extreme salt concentration. Enterococci have been used in traditional fermented food products to improve their typical taste and aroma due to various technological properties for many years. They also contribute to increase of product's shelf life. Although enterococci have various useful properties, they pose serious risk factors for human health due to increasing antibiotic resistance, to pose virulence factors that cause various diseases, production properties of biofilm and biogenic amines. In this review mechanism of antibiotic resistance, various virulence factors, biofilm and biogenic amine production properties of enterococci were attempted to be examined.

**Keywords:** Enterococci, antibiotic resistance, virulence factor, biofilm, biogenic amine

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ddmakpınar@hotmail.com,

☎ (+90) 246 211 1713,

☎ (+90) 246 237 0437

## GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) önemli bir üyesi olan enterokoklar özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen geleneksel fermente ürünlerin olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaktadırlar (1). Enterokoklar lipolitik ve esterolitik aktiviteleri ve sitrat kullanımı gibi metabolik faaliyetleri sayesinde bu gıdaların tipik tat ve aromalarının oluşumuna katkı sağladıkları gibi yakın akraba türler ve *Listeria monocytogenes* başta olmak üzere çeşitli gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı etkili bakteriyosinler (enterosin) üreterek de ürünün raf ömrünün uzamasına katkıda bulunmaktadır (2-4).

Enterokoklar peynir, sosis, sucuk, deniz ürünleri, kırmızı et ve kanatlı etleri gibi başta hayvansal gıdalar olmak üzere, su ve bitkilerden de yaygın olarak izole edilmektedirler (5, 6). Yapılan çalışmalar hayvansal gıdalardan sıklıkla izole edilen enterokok türlerinin *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* olduğunu göstermiştir (4, 7-10). Hayvansal gıdalardan izole edilen enterokok türleri arasında *E. faecalis*'in görülme sıklığının diğer türlere nazaran daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4, 7). Enterokokların bazı teknolojik ve probiyotik özelliklere sahip oldukları bilinmesine rağmen, bu bakterilerin sahip oldukları virülens özellikleri ve artan antibiyotik dirençleri fırsatçı patojen olarak kabul edilmelerine neden olmuştur. Enterokoklar özellikle endokardit, bakteriyemi, idrar yolları, merkezi sinir sistemi, karın içi ve pelvik enfeksiyonlara neden olmaktadır (1). *E. faecalis* ve *E. faecium* kaynaklı enfeksiyonlar, Dünya genelinde en sık karşılaşılan klinik enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (11). *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. raffinosus* kaynaklı enfeksiyonların ise görülme sıklığının daha düşük olduğu belirtilmektedir (12, 13). Gıda kaynaklı enterokokların tüketici sağlığı açısından bir diğer risk faktörü biyojen amin üretimidir. Yüksek miktarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi ciddi sağlık problemlerine yol açabilmektedir (14-16).

## ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Antibiyotik direnci, bakterilerin antimikrobiyel bir ajanın öldürücü ya da üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olarak ifade edilmektedir.

Enterokoklar klinik olarak kullanılan temel grup antibiyotiklere karşı doğal veya kazanılmış direnç gösterebilirler (17). Doğal direnç bakterinin temel özelliği olup, antibiyotik kullanımı ile ilişkili değildir. Bu durum bakterinin antibiyotiğin hedefi olan yapıyı taşıması ya da bakterinin yapısal özelliklerinden dolayı antibiyotiğin hedefine ulaşmamasından kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak antibiyotiklere karşı sonradan direnç kazanabilmektedir. Enterokoklar antibiyotik direnç genlerinin yayılmasını kolaylaştıran etkin genetik mekanizmalara sahiptirler (6).

Antibiyotik dirençli enterokoklar sadece klinik alanda değil aynı zamanda gıda endüstrisinde ve çiftlik hayvanlarıyla yakın temasta bulunan kişilerde de yaygın olarak karşılaşılan bir problemdir (18, 19). Antimikrobiyel ajanlar, besi hayvanlarında çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde, bakteriyel enfeksiyonlardan korumada ve gelişimi desteklemek amacıyla yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direncinin artışı arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Farklı veterinerlik uygulamaları nedeniyle dirençli bakteri oranlarında ülkelere bağlı farklılıklar gözlenmektedir. Özellikle kümes hayvanları, inekler ve domuzlardan glikopeptid dirençli *E. faecium* uzun yıllardır izole edilebilmektedir. Bazı ülkelerde makrolid dirençli enterokokların domuzlarda kümes hayvanlarından daha yüksek oranda gözlemlendiği belirtilirken, bazı ülkelerde de daha düşük direnç gözlemlendiği belirtilmektedir. Çeşitli ülkelerde ise quinupristin/dalfopristin dirençli *E. faecium* görülme sıklığının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (17). Özellikle Avrupa ve Asya'da çiftlik hayvanlarının beslenmesinde büyüme faktörü ve koruyucu ajan olarak avoparsin katkılı yemlerin kullanımı vankomisin dirençli enterokokların (VRE'nin) görülme sıklığını arttırmıştır (20, 21). İnsan tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile hayvanlarda gelişim artırıcı olarak kullanılan antibiyotikler arasında çapraz direnç bulunmaktadır. Çapraz direnç sonucunda hayvan gelişiminde kullanılan antimikrobiyeller, insanlarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlara dirence neden olmaktadır (22). Antibiyotik direnci yaygın antibiyotik kullanımının yanı sıra bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma mekanizmalarına bağlı olarak da ortaya çıkmaktadır.

Antibiyotik direncinin bakteriler arasında plazmit ve transpozon aracılığıyla aktarılabildiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19, 23-26).

Enterokoklarda 8 tip (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ve VanN) sonradan kazanılan (acquired) glikopeptid direnci rapor edilmiş olmakla birlikte VanC *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'da tanımlanmış doğal tip glikopeptid direncidir. Glikopeptidler peptidoglukan biyosentezini etkileyerek bakteriyel gelişimi inhibe ederler (27, 28). Glikopeptid direnci için biyokimyasal temel, antibiyotik hedefinin modifikasyonudur. Glikopeptid direnç gen kümeleri ligaz genlerine göre D-Ala-D-Lac ligaz ve D-Ala-D-Ser ligaz olarak adlandırılırlar. Glikopeptid dirençli enterokoklar D-Ala-D-Ala yerine, D-Ala-D-Lac (*vanA*, *vanB*, *vanD* ve *vanM*) veya D-Ala-D-Ser (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanN*) şeklinde sonlanan peptidoglukan öncülleri üreterek antibiyotiklerin bağlanma özelliğini azaltmaktadır. Enterokoklarda en sık rastlanan glikopeptid direnç fenotipi VanA tipidir ve genellikle yüksek vankomisin direnci (Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)  $\geq 128$   $\mu\text{g/mL}$ ) ile ilişkilidir. VanA tipi direnç gösteren suşların çoğu, aynı zamanda teikoplanine (MİK  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ) karşı da dirençlidir. Bu tip direnç, glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin, avoparsin ve ristosetin) ve basitrasin, polimiksin B veya robenidin gibi farklı antibiyotikler tarafından indüklenebilir. VanA fenotipi Tn1546 transpozonu üzerinde kodlu vankomisin direnç fenotipi oluşması için elzem olan 7 gen (*vanRSHXYZ*) içermektedir (17). VRE suşlarında vankomisin direnci iki bileşenli regülatör sistem (*vanR-vanS*) tarafından düzenlenmektedir. *vanS* geni tarafından kodlanan VanS vankomisin varlığını veya vankomisinin hücre duvarında meydana getirdiği ilk değişiklikleri tespit eden sensör olarak görev görür. VanS daha sonra yanıt regülatörü olan VanR'ye bir sinyal iletir ve VanR vankomisin direncinde görev alan diğer proteinlerin (VanH, VanA, VanX) sentezinin aktivasyonunu sağlar. VanH, pirüvatı D-Lac'a indirgeyen bir dehidrogenaz iken VanA, D-Ala ve D-Lac arasındaki ester bağlarını düzenleyen bir ligazdır. Vankomisinin D-Ala-D-Lac ucuna bağlanamaması sonucu vankomisine karşı dirençlilik gelişir. VanX, peptidoglukan bileşimini D-Ala-D-Ala'ya hidroliz eden bir dipeptidazdır ve bu olay vankomisine karşı duyarlılık gelişmesini önler. VanY, son

peptidoglukan kalıntılarının D-Ala ucunu hidroliz eden bir D, D-karboksipeptidazdır. Böylece D-Ala-D-Lac ucu, vankomisin direnci ile sonuçlanan peptidoglukan sentezinde, dipeptidin D-Ala-D-Ala ucunda yer alır. VanZ direnç mekanizmasının gelişmesinde yardımcı olup teikoplanin direncini de tetiklemektedir, ancak bu mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır (28).

Enterokok cinsi üyesi bakteriler genellikle penisilin, ampisilin, piperasilin ve imipenem gibi  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı doğal olarak düşük seviyede direnç gösterirler (29).  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin temel mekanizması, düşük affinitede penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) sentezlenmesidir.  $\beta$ -laktam direnci,  $\beta$ -laktam halkasının parçalanması sonucu ortaya çıkar. Eğer bakteri  $\beta$ -laktamaz veya penisilinaz enzimlerini ürettiyorsa, bu enzimler antibiyotiğin  $\beta$ -laktam halkasını parçalayarak antibiyotiği etkisiz hale getirirler (30).  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı bir başka direnç mekanizması *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Bu direnç mekanizmasında penisilin duyarlı DD-transpeptidaz enziminden farklı olarak bir LD-transpeptidaz görev almaktadır. Bu LD-transpeptidaz enzimi düşük konsantrasyonlarda (% 0.7) bulunur ancak  $\beta$ -laktamlara karşı duyarlı değildir. Dolayısıyla mutasyonlar ağırlıklı olarak LD-transpeptidaz fenotiplerin oluşmasına yol açmakta ve bu da  $\beta$ -laktam dirençli suşların görülmesine olanak sağlamaktadır (17).

Aminoglikozit grubu antibiyotikler 30S ribozomal alt ünitesinde 16S rRNA'ya bağlanarak protein sentezine engel olurlar (28). Yapılan çalışmalar, enterokokların aminoglikozitlere karşı geliştirdiği 3 tip direnç mekanizması olduğunu göstermiştir (31). Tüm enterokoklar, düşük hücrel geçirgenliklerinden dolayı aminoglikozitlere karşı orta seviyede doğal direnç (MİK, 62-500  $\mu\text{g/mL}$ ) gösterirler. Penisilin, aminoglikozitlerin hücre içine girişini kolaylaştırdığından bu doğal aminoglikozit direnci penisilin ilavesiyle çözümlenebilmektedir. Yüksek seviyede aminoglikozit direnci 30S ribozomal alt ünitesindeki bir proteini etkileyen belirli mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir (17). Bir diğer aminoglikozit direnç mekanizması ise rRNA metiltransferaz (EfmM) enziminin aktivitesi sonucu 16S rRNA modifikasyonu ile meydana gelmektedir (32). Aminoglikozitlere karşı yüksek seviyelerdeki dirençlilik, antibiyotik moleküllerini inaktive edebilen enzimlerin

sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Aminoglikozitlere karşı oluşan yüksek dirençlilik genelde fosfotransferazlar (APHs), asetiltransferazlar (AACs) ve nükleotidiltransferazlar (ANTs) gibi aminoglikozit modifiye edici enzimlerin aktiviteleri sonucu gerçekleşmektedir (17). Özellikle et ürünlerinden izole edilen enterokokların streptomisin dışındaki aminoglikozitlere yüksek oranda direnç gösterdikleri belirtilmiştir (33-35).

Makrolid ve linkozamid grubu antibiyotikler ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedirler. Bu grup antibiyotikler enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmamasına karşın penisilin alerjisi olan kişilerde penisilin yerine makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin tercih edilmesinin, enterokoklar arasında bu grup antibiyotiklere karşı direncin görülme sıklığını arttırdığı düşünülmektedir (28). Makrolid grubu antibiyotiklere karşı en yaygın gözlenen kazanılmış direnç, makrolidin ribozoma bağlanma affinitesini azaltan 23S rRNA alt ünitesinin metillenmesidir (Örneğin; *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *ermTR* genleri). Bu modifikasyon linkozamidlerin de bağlanma affinitesini azaltmaktadır (17, 28). Antibiyotik molekülünün lakton halkasının hidrolizi de diğer bir direnç mekanizmasıdır. Başka bir direnç mekanizması ise efluks pompalarıyla antibiyotik moleküllerinin bakteri hücrelerinden uzaklaştırılmasıdır (Örneğin; *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC* ve *mreA* genleri) (17). En sık rastlanan makrolid direnç determinantları *erm* genleridir. Bu genler bir metiltransferaz enzimi kodlamaktadır. Bu enzim 23S rRNA alt ünitesindeki adenin molekülünün N6-dimetilasyonuna neden olarak eritromisin bağlanmasını engellemektedir (36). Ribozomal hedefin modifikasyonu, makrolidler, linkozamidler ile streptogramin B arasında veya makrolidler ile linkozamidler arasında veya makrolidler, ketolidler ile streptogramin A ve B arasında çapraz dirence neden olmaktadır. Tanımlanmış *erm* genleri arasında enterokoklarda en sık rastlanana *ermB* genidir (34, 37, 38).

Tetrasiklin direnci klinik kaynaklı enterokok izolatlarında sıklıkla karşılaşılan bir antibiyotik direnci olmakla birlikte, çeşitli hayvansal gıdalarda da dirençli suşların varlığı tespit edilmiştir (4, 9). Enterokoklarda tetrasiklin direnci genellikle ribozomal koruma sağlayan *tet(M)* geni ile ilişkilidir. Ancak ribozomal korumayla ilişkili *tet(O)* ve

*tet(S)* gibi başka genler de tanımlanmıştır (39). Klinik izolatlarda *tet(M)* geninin genellikle Tn916 transpozonu üzerinde bulunduğu bunun yanı sıra konjugatif plazmit veya kromozom üzerinde de bulunabildiği bildirilmiştir. *tet(K)* ve *tet(L)* genleri tetrasiklinin dışarı atılmasını sağlayan pompaların kodlanmasında görevlidir (40). Diğer direnç genleri ise ribozoma bağlanarak onun yapısını modifiye eden ve tetrasiklinin ribozomlarla birleşmesini engelleyen proteinler kodlarlar (17).

Rifampisin RNA polimerazın  $\beta$  alt ünitesine (RpoB) bağlanıp, transkripsiyonun başlamasını engelleyerek bakteriyel gelişimi önlemektedir. Çoğu bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılan rifampisin enterokok enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmamasına rağmen enterokoklarda sıklıkla kazanılmış rifampisin direnci gözlenmektedir. Bu durumun diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavisi sırasında kommensal enterokokların antibiyotiğe maruz kalması ile oluştuğu düşünülmektedir. Doğal rifampisin dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* mutantlarının *in vitro* olarak izole edildiği belirtilmiştir (41). *rpoB* mutasyonu ile meydana gelen rifampisin direnci sefalosporin direncini etkilemezken, *rpoB* H486Y mutasyonunun sefalosporin direncinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (28).

Kinolonlar enterokoklara karşı orta seviyede aktivite göstermesine karşın, klinik uygulamalarda florokinolonların kullanılması enterokokların bu antibiyotiğe direnç kazanmasına neden olmaktadır. Kinolonlar özellikle DNA süper sarmalının kontrolünde görevli tip II topoizomerazlara (DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV) bağlanıp fonksiyonlarını yerine getirmelerini engelleyerek bakteri gelişimini inhibe etmektedirler. DNA girazın GryA ve topoizomeraz IV'ün ParC alt ünitelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda antibiyotiğin enzime bağlanması engellendiğinden enterokoklarda kinolon direnci ortaya çıkmaktadır (42, 43). Kinolonlara karşı tanımlanan bir diğer direnç mekanizması ise Qnr ailesi proteinler tarafından DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün kinolonlardan korunmasıyla sağlanmaktadır (44). Kinolonlara karşı gözlenen üçüncü direnç mekanizması ise efluks pompaları ile antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. EmeA (45) ve EfrAB (46) kinolon direnci için tanımlanan efluks pompalarıdır.

Oksazolidinon grubu antibiyotiklerin temsilcisi olan linezolid Gram pozitif bakterilere karşı yüksek

antimikrobiyel aktivite (MİK, 4 µg/mL) gösterir (47). 23S ribozomal alt üniteye meydana gelen mutasyon bu antibiyotiğe karşı direnç (MİK, 8 µg/mL) oluşmasına neden olmaktadır. Meydana gelen direnç seviyesi mutasyona uğrayan rRNA genlerinin allellerinin sayısına bağlıdır. Linezolidle dirençli suşlar aynı zamanda vankomisin, ampisilin, makrolidler, florokinolonlar, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, nitrofurantoin ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi diğer antibiyotiklere karşı da direnç gösterebilirler (48).

Kloramfenikol direnci çoğunlukla kloramfenikolü inaktive eden kloramfenikol asetiltransferazların varlığı ile gerçekleşmektedir. Membrana özel taşıyıcılar ile antibiyotiğin dışarı atılması diğer bir direnç mekanizmasını oluşturmaktadır. Kloramfenikol asetiltransferazları ve özel taşıyıcıları kodlayan genler sıklıkla plazmitler, transpozonlar veya gen kasetleri ile ilgilidir. Kloramfenikol direnci aynı zamanda dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olan 23S rRNA'da meydana gelen mutasyonlar, kloramfenikolün 3-O-fosfotransferazlar ile inaktive edilmesi veya 23S rRNA metilaz ile hedef bölgenin modifikasyonu ile de oluşmaktadır (49).

### VİRÜLENS FAKTÖRLER

Mikroorganizmaların hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller virülens faktörler olarak isimlendirilmektedir. Enterokoklar arasında en yüksek virülense tıbbi izolatlar sahipken, bu sıralamayı gıda izolatları ile starter suşlar izlemektedir (50, 51). Enterokoklarda sitolizin/hemolizin, jelatinaz, agregasyon maddesi (Agg), adhezin kollojen (Ace, Acm), hücre dışı yüzey proteini (Esp), seks feromonları, adhezin benzeri endokarditis antijenleri (EfaA) ve hiyalüronidaz (hyl) gibi virülens faktörlerin bulunduğu belirtilmektedir (52, 53).

Agregasyon maddesi (Agg) *E. faecalis* suşlarında tanımlanan bir yüzey proteini olup, agregat oluşturarak konjugasyon süresince plazmit transferini kolaylaştırmaktadır (54, 55). Agg enterokokal hücre yüzeyinin hidrofobitesini arttırmaktadır. Bu durum kolesterol lokalizasyonuna sebep olarak kolesterolün lizozomal araçlarla birleşmesini geciktirir veya engeller (56). Agg integrinler tarafından tanınan Arg-Gly-Asp aminoasit motifini içerir. Bu sayede Agg insan makrofajları ve farklı intestinal epitelyum hücreleri gibi çeşitli hücrelere

bağlanabilirler. Hem adhezin hem de invazin olarak görev yaptığından önemli bir virülens faktör olarak değerlendirilmektedir (57, 58). *E. faecalis*'de tanımlanan diğer bir yüzey proteini adhezin kollojen (Ace)'dir. Hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı sağladığından özellikle *E. faecalis* endokarditlerinde yaygın olarak Ace ile karşılaşılmaktadır (54).

Hücre dışı yüzey proteini (Esp), hücre duvarıyla ilişkili bir protein olup ilk kez *E. faecalis* MMH5594 suşunda tanımlanmıştır (59). 5622 baz çifti içeren *esp* geni tarafından kodlanan Esp, klinik izolatlarda sıklıkla görülmektedir. Esp'nin adezyon ve kolonizasyonu desteklediği, bağışıklık sistemini engellediği ve antibiyotik direnci üzerinde de rol oynadığı belirtilmektedir (1). Esp'nin aynı zamanda çevresel strese direnç sağlayan enterokokal biyofilm oluşumunda ve üriner sistem gibi ökaryotik hücrelere adezyonu sağlamada da etkili olduğu belirtilmektedir (60, 61). Yapılan çalışmalarda *esp* genindeki bozulmanın *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğini de engellediği, *esp* *E. faecalis* suşlarına plazmit aracılığı ile *esp* geninin aktarılmasından sonra ise biyofilm üretebildikleri belirtilmiştir (62).

Enterokok türleri tarafından salgılanan virülens faktörler de patojenite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Sitolizin/ hemolizin feromon sorumlu plazmit üzerinde yer alan genler tarafından kodlanan fakat kromozomal olarak da kodlanabilen bakteriyel bir toksindir (54). Sitolizin diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahipken, insanlar için de β-hemolitik özellik göstermektedir. Sitolizin iki bileşenli sistemden oluşan quorum-sensing mekanizması ile kontrol edilmektedir. Sitolizinler lökositler ve makrofajlara zarar vererek immun sistem üzerinde etkili olmakta ve doku hasarına yol açmaktadırlar. Yapılan çalışmalar bu genlerin klinik izolatlarda daha yaygın gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Patojen enterokok suşlarında sitolizin üretim miktarının, patojen olmadığı düşünülen suşlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (63).

Hiyalüronidaz, jelatinaz ve serin proteaz gibi hidrolitik enzimlerin rolleri tam olarak bilinmese de virülens faktörler arasında yer almaktadırlar. Hiyalüronik asit üzerine etkili yıkıcı bir enzim olan hiyalüronidaz doku hasarına neden olmaktadır. Hiyalüronidaz kromozomal *hyl* geni üzerinde kodlanmıştır. Hiyalüronidaz dokulardaki

mukopolisakkaritleri parçalayarak enterokokların ve toksinlerinin konak hücrede yayılmasını kolaylaştırmaktadır (64). Jelatinaz, *E. faecalis* tarafından sentezlenen ekstraselüler çinko içeren metaloendopeptidazdır (54). Jelatinaz jelatin, kazein, hemogloblin ve diğer biyoaktif peptitlerin hidrolizine neden olarak dokularda bakteriyel yayılımı arttırmaktadır (65, 66). Jelatinaz üretiminden sorumlu *gelE* geni kromozomal DNA üzerinde kodludur ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak regüle edilmektedir (18).

Seks feromonları kromozomal DNA üzerinde kodlu, suşlar arasında plazmit DNA'nın konjugatif transferini kolaylaştıran ve 7-8 aminoasit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. Enterokok suşlarında seks feromonlarının üretimi virülens determinantların ve antibiyotik dirençliliğinin feromon yanıt veren konjugatif plazmitler (pheromone-responding conjugative plasmids) aracılığı ile diğer enterokok suşlarına yayılmasını teşvik etmektedir. Bu durum patojenitenin diğer bakterilere aktarılmasını yaygınlaştırmaktadır (64, 67).

Yapılan çalışmalar özellikle klinik enterokok izolatlarında virülens faktörlerin yaygın olarak gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen klinik izolatlarda çoğu virülens genlerin (*cylA*, *gelE*, *efaA*, *ace*, *asa*) bulunduğu ancak bazı durumlarda fenotipik olarak düşük seviyede gözlemlendiği belirtilmiştir. Diğer taraftan enterokoklarda bulunan virülens faktörlerin izolatan kaynağına göre farklılık gösterdiği ifade edilmektedir. Endodontik enterokok izolatlarında ifade edilmeyen virülens genler tespit edilirken, klinik enfeksiyonlardan izole edilen enterokok suşlarında daha fazla virülens faktör gözlemlendiği belirtilmiştir (7, 68). Valenzuela vd. (69), deniz ürünlerinden izole ettikleri *E. faecium*'larda yaygın olarak *efaA<sub>fm</sub>* virülens faktörünün gözlemlendiğini, *gelE*, *esp* ve *ccf*'nin ise yalnızca bir izolatta bulunduğunu belirtmişlerdir. İnoğlu ve Tuncer (53) tulum peynirinden elde ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının hepsinin en az bir virülens faktör taşıdıklarını, *gelE*, *efaA<sub>fm</sub>*, *efaA<sub>fs</sub>*, *ccf*, *sp<sub>fm</sub>*, *esp<sub>fs</sub>* ve *agg*'nin izolatlarda tespit edilen virülens faktörler olduklarını belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada keçi sütünden izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. hirae* izolatlarının hepsinde *esp* ve *gelE* varlığı tespit edilmesine karşın jelatinaz üretimi fenotipik olarak sadece üç adet *E. faecalis*'de tespit edilmiştir (70). Farklı kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalar

bitkisel ve hayvansal kaynaklı fermente ürünlerden izole edilen enterokoklarla, probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan enterokokların sahip oldukları virülens faktörler nedeniyle daha iyi incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (53, 71).

## BIYOFİLM ÜRETİMİ

Biyofilm ekzopolimerik bileşenler, proteinler, nükleik asit ve polisakkaritlerden oluşan sulu bir matris olup, çeşitli canlı ve cansız yüzeyler üzerine tutunmuş hücre popülasyonudur (72). Biyofilm oluşumu yüzeye tutunma ve bağlanma, hücreler arası interaksiyon, bitişik bir biyofilm oluşumu ve üç boyutlu biyofilm oluşumu olmak üzere kompleks bir dizi basamaktan oluşmaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler serbest hallerinden daha farklı özellik göstermektedir (73). Biyofilm içerisindeki organizmalar besin eksikliği, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı planktonik bakterilerden daha dirençlidirler. Olgun bir biyofilm tabakası, normal bir bakterinin öldürülmesi için gerekli antibiyotik konsantrasyonunun 10-1000 kat fazlasını tolere edebilmektedir. Biyofilmler birçok hastalığın kaynağı olup ortadan kaldırılması oldukça zordur. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) hastalıkların % 60'ının biyofilm oluşturan bakterilerden kaynaklandığını belirtmektedir (74). Biyofilm içerisindeki bakteriler, kalp kapakçık iltihabı, ateşli yara enfeksiyonları, kronik orta kulak iltihabı ve kistik fibröz gibi hastalıklara sebep olmanın yanında kateterler, yapay kalp pilleri, protez kalp kapakçıkları ve ortopedik cihazlar gibi çeşitli medikal ekipmanlar üzerinde de kolonize olabilmektedir (73).

Ortamda bulunan glukoz, serum gibi besin elementleri ile demir ve karbondioksitin kullanılabilirliği, ozmotik basınç, pH ve sıcaklık biyofilm üretimini etkileyen faktörlerdir. Karbonhidrat metabolizması, *E. faecalis*'in de arasında bulunduğu çeşitli Gram pozitif bakterilerin biyofilm üretimini düzenlemektedir (75). *E. faecalis* tarafından biyofilm oluşumunda Esp adhezyon proteini (enterokokal yüzey proteini), *epb* lokusu tarafından kodlanan pili, lipoteikoik asit (LTA) alanin esterifikasyonu (DltA) ve hücre duvarı ile ilişkili polisakkaritin sentezi için gerekli glikotransferazın (Epa) dahil olduğu pek çok mekanizma tanımlanmıştır (73, 76-79). Ancak bu mekanizmalar içerisinde en iyi tanımlanan Esp'dir. Esp epitel

yüzeyle tutunma, biyofilm oluşturma gibi özelliklerinden sorumludur. Yapılan çoğu çalışma ile *esp*<sup>+</sup> izolatların biyofilm oluşturduğu, *esp*<sup>-</sup> izolatlarda ise biyofilm oluşumunun gözlenmediği tespit edilmiştir (60, 80). Diğer taraftan *esp<sub>fm</sub>* geni taşıyan *E. faecalis* suşlarının bu geni taşımayan suşlara göre daha yüksek konjugasyon oranına sahip olduğu ve ampisilin, siprofloksasin ve imipenem antibiyotiklerine daha yüksek direnç gösterdiği belirtilmiştir (65). Biyofilm oluşumunda bir diğer önemli faktör polisakkarit antijenleridir. Polisakkarit antijenleri enterokokal polisakkarit antijen (*epa*) gen kümesinde de bulunan *orfde1*'den *orfde16*'ya kadar sıralanan genler tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalar polisakkarit sentezi için *orfde4* (*epaB*) ve *orfde6* (*epaE*) genlerinin gerekli olduğunu göstermiştir (76, 77).

### BIYOJEN AMİN ÜRETİMİ

Biyojen aminler aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu ile oluşan, düşük molekül ağırlıklı, toksik azotlu bileşiklerdir (81-83). Aminoasitlerden karbondioksitin ayrılması olarak tanımlanan dekarboksilasyon olayı, dekarboksilaz enzimi ile gerçekleşmekte ve bu enzim bitkisel ve hayvansal dokular ile mikroorganizmalar tarafından oluşturulabilmektedir (84). Gıdalarda biyojen amin oluşumu çoğunlukla serbest aminoasitlerin mikrobiyel dekarboksilasyonu sonucu meydana gelmektedir (85). Biyojen aminler çoğunlukla balık ve balık ürünleri, fermente et ve süt ürünleri ile çeşitli fermente gıdalarda gözlenmektedir. Gıda ve içeceklerde karşılaşılan en önemli biyojen aminler sırasıyla histidin, tirozin, ornitin, lizin ve  $\beta$ -fenilalanin dekarboksilasyonu sonucu ortaya çıkan histamin, tiramin, putresin, kadaverin ve  $\beta$ -feniletilamindir (86). Biyojen aminler kimyasal yapılarına göre alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) olarak sınıflandırılabilirler gibi amin gruplarına göre monoaminler (tiramin, feniletilamin), diaminler (putresin, kadaverin) ve poliaminler (spermin, spermidin) olarak da sınıflandırılabilirler. Biyojen aminlerin oluşumu pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların yanı sıra, ortamda serbest aminoasitlerin ve

yüksek dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların varlığı ile mikroorganizmaların gelişimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (87, 88). Biyojen amin biyosentezi ökaryotik hücrelerde hormon, alkaloid, nükleik asit ve protein sentezleri için elzemdir. Bazı biyojen aminler nörotransmitter olarak görev alırken, bazıları da DNA, RNA ve protein sentezinin düzenlenmesi gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Biyojen amin üretimi bakterilerde enerji eldesi için bir yol olabileceği gibi ozmotik ve oksidatif stres yanıtları gibi diğer fizyolojik fonksiyonlara da aracılık edebilmektedir (88). Biyojen aminler çeşitli biyolojik faktörler için gerekli olsalar da gıdalarla birlikte yüksek oranda tüketilmeleri toksik etkiye sebep olmaktadır. Düşük oranlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi durumunda biyojen aminler oksidazlar vasıtasıyla sindirim sisteminde fizyolojik olarak daha az aktif formlara dönüştürülmektedir. Ancak yüksek miktarlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi veya çeşitli nedenlerle detoksifikasyonun engellenmesi sonucunda adrenal ve noradrenalin salınımı, mide asidi salgılanması, migren, taşikardi, kalp hastalıkları, kan şekeri ve kan basıncının yükselmesi gibi ciddi problemlere yol açmaktadır (14-16).

Biyojen amin üretimi, dekarboksilaz ve aminoasit/amin değişimi için gerekli olan en az iki genin ifade edilmesi ile gerçekleşmektedir. Bu genler daima bağlı olmakla birlikte bazı durumlarda regülasyon için üçüncü bir genle organize olabilmektedir. Biyojen amin üretimi için histidin dekarboksilaz (*hdc*), tirozin dekarboksilaz (*tdc*), lizin dekarboksilaz (*ldc*) ve ornitin dekarboksilaz (*odc*) genleri farklı bakteri suşlarında tespit edilmiştir. Biyojen amin üretimi için gerekli genler bazı durumlarda plazmit üzerinde kodlanmışken, bazı durumlarda yatay gen transferi ile de kazanılmış olabilmektedir. Biyojen amin üretimi genel olarak suşa özgü bir özellik iken tiramin biyosentezi *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*'da tür düzeyinde bir özellik olarak tanımlanmaktadır (89). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı enterokok suşlarının biyojen amin üreticisi oldukları belirtilmiştir (10, 53, 90). Dondurulmuş sardalya ve uskumrudan izole edilen *E. durans* suşlarının tiramin üreticisi olup, *tdc* genine sahip oldukları belirtilirken (84), şaraptan izole edilen *E. faecium* suşlarının hepsinde tiramin üretimi tespit edilmiş, histamin ve putresin üretimine

rastlanmadığı bildirilmiştir (91). Pişmemiş deniz ürünlerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarında ise histamin, tiramin, putresin ve kadaverin üretimlerine rastlandığı ifade edilmiştir (69). Jiménez vd. (92) tarafından yapılan çalışmada farklı memeli sütlerinden elde edilen enterokok izolatlarının hepsinde (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*) tiramin üretimi tespit edilirken, histamin üretimi gözlenmemiştir. Diğer taraftan tüm *E. faecalis* izolatlarında ise putresin üretimi tespit edilmiştir. İnoğlu ve Tuncer (53) Tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının histidin, lizin, ornitin dekarboksilasyonuna sahip olmadıklarını ancak izolatların % 92.9'unun *tdc* genine sahip olup, tiramin üreticisi olduklarını belirtmiştir. Yüceer ve Özden Tuncer (10) tarafından yapılan çalışmada sucuk örneklerinden izole edilen LAB'nin hiçbirinde histidin, lizin, ornitin dekarboksilasyonu ve dekarboksilasyon genleri (*bdc*, *ldc*, *odc*) tespit edilemezken, enterokok suşlarının % 68'inde tirozin dekarboksilaz geninin (*tdc*) tespit edildiği ve bu suşların tiramin üreticisi oldukları belirtilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarla enterokoklarda özellikle tiramin üretiminin oldukça yaygın olduğu belirtilmiştir (8, 70, 91, 93-96).

## SONUÇ

LAB'nin önemli bir üyesi olan enterokoklar farklı metabolik aktiviteleri sayesinde çeşitli geleneksel fermente gıdaların kendilerine has tat ve aromalarının oluşmasında önemli rol oynamalarının yanı sıra bazı türlerinin fırsatçı patojen oldukları bilinmektedir. Gıda kaynaklı enterokokların aktarılabildiği antibiyotik direnç genlerine sahip olmaları, plazmit ve transpozonlar aracılığı ile antibiyotik direncinin insan sindirim sisteminde diğer enterokoklara veya bakteri türlerine aktarım riskini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle antibiyotik dirençli gıda kaynaklı enterokoklar direnç genlerinin yayılımı için rezervuar görevi görmektedir. Antibiyotik direncinin yanı sıra enterokoklar tüketici sağlığı açısından risk teşkil eden çeşitli virülens faktörlere, biyofilm ve biyojen amin üretim özelliğine sahiptirler. Bu nedenle starter kültür olarak kullanılacak enterokok suşlarının seçiminde teknolojik özelliklerinin yanı sıra antibiyotik direnci, virülens faktör içermesi ve biyojen amin üretimi gibi özelliklerinin de seçim kriteri olarak göz önüne alınması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, de Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106: 1-24.
2. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol*, 151: 125-140.
3. Özden Tuncer B, Ay Z, Tuncer Y. 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Turk J Biol*, 37: 443-449.
4. Morandi S, Silveti T, Miranda Lopez JM, Brasca M. 2015. Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina Casera Cheese. *J Food Safety*, 35: 193-205.
5. Komprda T, Sladkova P, Petirova E, Dohnal V, Burdychova R. 2010. Tyrosine and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat Sci*, 86: 870-877.
6. Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, van Schaik W, Weaver K. 2013. Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker. *IJMM Int J Med Microbiol*, 303: 360-379.
7. Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, Laniewska-Trokenheim L. 2012. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. *Afr J Microbiol Res*, 6 (39): 6773-6780.
8. Tuncer Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Afr J Biotechnol*, 8 (24): 7008-7016.
9. Yoğurtçu NN, Tuncer Y. 2013. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Int J Dairy Technol*, 66 (2): 236-242.
10. Yüceer Ö, Özden Tuncer B. 2015. Determination of antibiotic resistance and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from fermented Turkish Sausage (Sucuk). *J Food Safety*, 35: 276-285.
11. ECDC. 2011. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe, Stockholm, SE.



12. Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 1630-1634.
13. Dahlén G, Blomqvist S, Almståhl A, Carlén A. 2012. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol*, 4: 10855. DOI: 10.3402/jom.v4i0.10855
14. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int*, 29: 675-690.
15. Ladero V, Calles Enr quez M, Fernández M, Alvarez MA, 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr Nutr Food Sci*, 6: 145-156.
16. Talon R, Leroy S. 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci*, 89: 303-309.
17. Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial resistance in enterococci. *J Infect Dis Ther*, 2 (4): doi: 10.4172/2332-0877.1000150.
18. Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155 (6): 1749-1757.
19. Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Zaid CZM, Yardi A, Shukor RA, Marawin LT, Embong F, Aziz SA. 2012. Characterization and risk factors of vancomycin-resistant enterococci (VRE) among animal-affiliated workers in Malaysia. *J Appl Microbiol*, 113: 1184-1195.
20. Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Kim SH, Park YH. 2007. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol*, 113: 102-107.
21. Chan YY, Nasir MHBA, Yahaya MAB, Salleh NMAB, Dan ADBM, Musa AMB, Ravichandran M. 2008. Low prevalence of vancomycin and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. *Int J Food Microbiol*, 122: 221-226.
22. Coglian C, Goossens H, Greko C. 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. Banning nonessential antibiotic uses in food animals is intended to reduce pools of resistance genes. *Microbe*, 6 (6): 274-279.
23. Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24: 718-732.
24. Frye JG, Lindsey RL, Meinersmann RJ, Berrang ME, Jackson CR, Englen MD, Turpin JB, Fedorka-Cray JP. 2011. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne Pathog Dis*, 8: 663-679.
25. Harada T, Kawahara R, Kanki M, Taguchi M, Kumeda Y. 2012. Isolation and characterization of vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from retail poultry in Japan. *Int J Food Microbiol*, 153: 372-377.
26. Glenn LM, Englen MD, Lindsey RL, Frank JF, Turpin JE, Berrang M E, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Frye, JG. 2012. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microb Drug Resist*, 18: 453-463.
27. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, 42 (1): 25-34.
28. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Ed.), Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/> (Erişim tarihi Ocak 2016).
29. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, 4 (2): 239-249.
30. Templer SP. 2006. Antibiotic Resistant Enterococci From Food and Clinical Samples: Microbiological Characterization, Molecular Typing and Genetic Relation of Strains. Inauguraldissertation der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern, M. Sc. Thesis, Zürich, 72 p.
31. Chow JW. 2000. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*, 31: 586-589.
32. Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS one*, 7 (1): 1-10.
33. Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Laukova A, Elias M, Tenreiro R, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2011. Antibiotic resistance and virulence factors among enterococci isolated from chourico, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *J Food Prot*, 74: 465-469.

34. Jamet E, Akary E, Poisson MA, Chamba JF, Bertrand X, Serror P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol*, 31: 191-198.
35. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. 2012. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol*, 156: 222-230.
36. Pechère JC. 2001. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents*, 18: 25-28.
37. Martel A, Meulenaere V, Devriese LA, Decostere A, Haesebrouck F. 2003. Macrolide and lincosamide resistance in the Gram-positive nasal and tonsillar flora of pigs. *Microb Drug Resist*, 9: 293-297.
38. Jaglic Z, Vlkova H, Bardou J, Michu E, Cervinkova D, Babak V. 2012. Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. *Zoonoses Public Health*, 59 (3): 202-211.
39. Aarestrup FM, Agero Y, Gerner Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 37: 127-137.
40. Leclercq R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*, 24: 80-84.
41. Kristich CJ, Little JL, Hall CL, Hoff J.S. 2011. Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *mBio*, 2 (6): e 00199-11.
42. Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde Gomez JA, Klare I, Witte W. 2010. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents*, 35 (2): 119-125.
43. Palmer KL, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore M.S. 2011. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (7): 3345-3356.
44. Mascher T, Helmann JD, Uden G. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70 (4): 910-938.
45. Jung YH, Shin ES, Kim O, Yoo JS, Lee KM, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. 2010. Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (11): 4744-4749.
46. Valenzuela, AS, Lerma, LL, Benomar N, Gálvez A, Pulido, RP, Abriouel H. 2013. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog Dis*, 10: 143-149.
47. Diekema DJ, Jones RN. 2001. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 358: 1975-1982.
48. Jones RN, Della Latta P, Lee LV, Biedenbach DJ. 2002. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42 (2): 137-139.
49. Roberts, MC, Schwarz S. 2009. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. In: *Antimicrobial Drug Resistance*, Mayers, ML (ed.), Humana Press, pp. 183-193.
50. Busani L, Del Grosso M, Paladini C, Graziani C, Pantosti A, Biavasco F, Caprioli A. 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int J Food Microbiol*, 97: 17-22.
51. Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NM, Franz CM, Holzapfel WH, Pérez-Pulido R, Martínez Canamero M, Gálvez A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol*, 27, 118-130.
52. Willems RJ, Bonten MJ. 2007. Glycopeptide resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, 20: 384-390.
53. İnoğlu Z, Tuncer Y. 2013. Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *J Food Safety*, 33: 369-377.
54. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822-830.

55. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. 2008. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*, 299 (5): 323-332
56. Eaton TJ, Gasson MJ. 2002. A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 216: 269-275.
57. Saringen S, Rozdzinski E, Muscholl Silberhorn A, Marre R. 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization but not translocation of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 68 (10): 6044-6047.
58. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonnè F, Joly B. 2002. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol*, 15: 375-380.
59. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke M, Lindahl G, Gilmore M. 1999. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, 67: 193-200.
60. Toledo Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta Cuceralla, C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 67 (10): 4538-4545.
61. Borgmann S, Niklas DM, Klare I, Zabel LT, Buchenau P, Autenrieth IB, Heeg P. 2004. Two episodes of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 207: 386-389.
62. Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, 329 (11): 849-857.
63. Fernandes SC, Dhanashree B. 2013. Drug resistance virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Med Res*, 137 (5): 981-985.
64. Kayaoglu G, Ørstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15: 308-320.
65. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. 2008. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, 32 (5): 374-377.
66. Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. 2008. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian Patients with haematological disorders. *J Hosp Infect*, 68 (2): 137-144.
67. Devriese LA, Baele M, Butaye P. 2006. The genus *Enterococcus*: taxonomy. *Prokaryotes*, 4: 163-174.
68. Solheim M, Aakra Å, Snipen LG, Brede DA, Nes I. 2009. Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics*, 10: 194-205.
69. Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Cañamero MM, Gálvez A. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol*, 27: 955-961
70. Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Nero LA. 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol* 185: 121-126.
71. Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med*, 56 (7): 352-357.
72. Costerton JW. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol*, 9: 50-52.
73. Mohamed JA, Huang DB. 2007. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*, 56: 1581-1588.
74. Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 999-1007.
75. Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Murray BE, Inouye RT. 2004. Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 190: 967-970.
76. Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE, Weinstock GM. 2000. Analysis of gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun*, 68 (2): 815-823.

77. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 72: 3658-3663.
78. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. 2006. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 74 (7): 4164-4171.
79. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE. 2006. Endocarditis and biofilm associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Investig*, 116: 2799-2807.
80. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. 2004. Enterococcal surface protein Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 72: 6032-6039.
81. Bardócz S. 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol*, 6: 341-346.
82. Santos S, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*, 29: 213-231.
83. Gingerich TM, Lorca T, Flick GJ, Pierson MD, Mc Nair HM. 1999. Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh stored and temperature abused bluefish. *J Food Protect*, 62: 1033-1037.
84. Fadhlaoui-Zid K, Curiel JA, Landeta G, Fattouch S, Reverón I, de las Rivas B, Sadok S, Muñoz R. 2012. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food Control*, 25: 89-95.
85. Halász A, Baráth Á, Simon Sarkadi L, Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol*, 5: 42-49.
86. Alvarez MA, Moreno Arribas MV. 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci Technol*, 39: 146-155.
87. Ladero V, Sánchez Llana E, Fernández M, Alvarez MA. 2011. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *Int J Food Sci Technol*, 46: 516-521.
88. Linares DM, Martin C, Ladero V, Alvarez MA, Frenández M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51: 691-703.
89. Ladero V, Fernández M, Calles Enriquez M, Sánchez Llana E, Cañedo E, Martin MC, Alvarez MA. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol*, 30: 132-138.
90. Lorencová E, Bunková L, Matoulková D, Dráb V, Pleva P, Kubán V, Bunka F. 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *Int J Food Sci Technol*, 47: 2086-2091.
91. Capozzi V, Ladero V, Beneduce L, Fernández M, Alvarez MA, Benoit B, Laurent B, Grieco F, Spano G. 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiol*, 28: 434-439.
92. Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol*, 13 (288):1-12.
93. Kucerová K, Svobodová H, Tuma S, Ondráčková I, Pločková M. 2009. Production of biogenic amines by enterococci. *Czech J Food Sci*, 27: 50-55.
94. Lu S, Xu X, Zhou G, Zhu Z, Meng Y, Sun Y. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control* 21: 444-449.
95. Muñoz Atienza E, Landeta G, de Las Rivas B, Gómez Sala B, Muñoz R, Hernández PE, Cintas LM, Herranz C. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int J Food Microbiol*, 146: 212-216.
96. Kalhotka L, Cwiková O, Črtková Kovárová V, Matousovál Z, Prichystalová J. 2012. Changes in counts of microorganisms and biogenic amines production during the manufacture of fermented sausages Polican. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 2 (2): 667-683.