

**PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD
DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA VİRÜLENS FAKTÖRLERİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI***

Degnide Ephrem Adifon, Yasin Tuncer**

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

Geliş / Received: 13.05.2019; Kabul / Accepted: 07.07.2019; Online baskı / Published online: 25.07.2019

Adifon, D.E., Tuncer, Y. (2019). Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklarda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. *GIDA* (2019) 44 (4): 719-732 doi: 10.15237/gida.GD19075

Adifon, D.E., Tuncer, Y. (2019). Investigation of virulence factors using phenotypic and genotypic methods in high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from cheese. *GIDA* (2019) 44 (4): 719-732 doi: 10.15237/gida.GD19075

ÖZ

Bu çalışmanın amacı daha önce peynir örneklerinden izole edilen yüksek-seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) 54 enterokok izolatında virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak araştırılmasıdır. YSAD enterokok izolatlarında α -hemolitik (48.15 %), γ -hemolitik (46.30 %), ve β -hemolitik (5.55 %) aktivite fenotipik olarak belirlendi. Jelatinaz aktivitesi yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarında tespit edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *E. faecium* RS32.2 hariç YSAD enterokok izolatlarında en az bir virülens genin varlığı belirlendi. YSAD enterokok izolatlarında en sık görülen genlerin *acf* (% 88.89), *efaA₅* (% 85.19), *acm* (% 77.78), *gelE* (% 59.2), *cpd* (% 51.85) ve *esp₅* (% 50) olduğu tespit edildi. Fenotipik ve genotipik testler sonucu, 30 YSAD enterokok izolatında sessiz *gelE* geni bulundu. Peynirden izole edilen YSAD enterokok suşlarında yüksek sıklıkla virülens faktör genlerinin tespit edilmesi tüketici sağlığı için endişe uyandırıcıdır.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus*, peynir, yüksek seviyede aminoglikozid direnci, virülens faktör, polimeraz zincir reaksiyonu

**INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS USING PHENOTYPIC
AND GENOTYPIC METHODS IN HIGH-LEVEL AMINOGLYCOSIDE
RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM CHEESE**

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the virulence factors using phenotypic and genotypic methods in 54 high-level aminoglycoside resistant (HLAR) enterococci previously isolated from cheese samples. The α -hemolytic (48.15 %), γ -hemolytic (46.30 %), and β -hemolytic (5.55 %) activities phenotypically were determined in HLAR enterococci. Gelatinase activity was detected in only *E. faecalis* RG22.4, RG26.1, and RG26.2 strains. At least one virulence factor gene was determined using polymerase chain reaction (PCR) in HLAR isolates except *E. faecium* RS32.2. The most frequently virulence genes were detected as *acf* (88.89 %), *efaA₅* (85.19 %), *acm* (77.78 %), *gelE* (59.2 %), *cpd* (51.85 %), and *esp₅* (50 %) in HLAR enterococci isolates. As a result of phenotypic and genotypic tests, silent *gelE* genes were found in 30 HLAR enterococci isolates. Detection of high frequency of virulence factor genes in HLAR enterococci strains isolated from cheese is worrying for consumer health.

Keywords: *Enterococcus*, cheese, high-level aminoglycoside resistance, virulence factor, polymerase chain reaction

* Bu araştırma Degnide Ephrem Adifon'un yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışma International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Ankara/Türkiye'de poster olarak sunulmuş ve kongre kitabında özet olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Degnide Ephrem Adifon. This study was presented as a poster at the International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Ankara/Turkey, and it was published as an abstract in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉ yasintuncer@sdu.edu.tr

☎ (+90) 246 211 1713

☎ (+90) 246 237 0437

GİRİŞ

Enterokoklar, insan ve hayvan bağırsak florasında doğal olarak bulunan ve aynı zamanda çığ gıda maddelerinden ve çeşitli geleneksel fermente gıdalardan sıklıkla izole edilen laktik asit bakterileridir (Foulquié Moreno vd., 2006; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017; Hanchi vd., 2018). Akdeniz ülkelerinde geleneksel peynirlerin mikrobiyotasının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, enterokokların inek sütüne nazaran yaygın olarak keçi ve koyun sütünden üretilen peynirlerin olgunlaşma sürecinde proteolitik, lipolitik ve sitrat yıkım mekanizmaları ile tipik tat ve aromanın oluşumunda önemli rol oynadıklarını göstermiştir (Foulquié Moreno vd., 2006). Ayrıca, bazı enterokok suşları *Listeria monocytogenes* gibi gıdalarda bulunan patojenlere karşı güçlü antibakteriyel etkiye sahip olmalarından dolayı farklı gıda ürünlerinin muhafazasında koruyucu olarak kullanılmakta ve aynı zamanda probiyotik olarak da kabul edilmektedirler (Hanchi vd., 2018).

Probiyotik ve teknolojik özelliklerine rağmen, bazı enterokok türü üyelerinin antibiyotik direnç ve virülens faktörler gibi tüketici sağlığı için risk teşkil eden özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2019). Enterokoklar endokarditis, bakteriyemi, idrar yolu, merkezi sinir sistemi, karın içi, pelvik ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilen nozokomiyal patojenler olarak da tanımlanmaktadır (Reyes vd., 2017). Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* kaynaklı enfeksiyonlar, Dünya genelinde en sık karşılaşılan klinik enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. raffinosus* kaynaklı enfeksiyonların ise görülme sıklığının daha düşük olduğu belirtilmektedir (Ogier ve Serror, 2008). Son yıllarda gıda kaynaklı enterokokların yaygın aktarılabılır antibiyotik direnç ve virülens faktör geni içermeleri tüketici sağlığı açısından endişe uyandırmaktadır (Inoğlu ve Tuncer, 2013; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2019). Gentamisin ve streptomisin yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde kullanılan

aminoglikozid grubu antibiyotiklerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar Dünya genelinde gıda ve klinik örneklerden yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) enterokok suşlarının izole edildiğini göstermiştir (Choi ve Woo, 2013; Niu vd., 2016; Özdemir, 2018; Sparo vd., 2018). Gram pozitif bakterilerde en sık karşılaşılan yüksek seviyede aminoglikozid direnç mekanizması antibiyotığın aminoglikozid modifiye edici enzim ile modifikasyonudur (Bismuth ve Courvalin, 2010; Niu vd., 2016; Sparo vd., 2018). Enterokoklarda tanımlanmış başlıca virülens faktörler agregasyon maddesi, kollojen bağlayan protein, endokarditis spesifik antijeni, enterokokal yüzey proteini, sitolizin, jelatinaz, hiyaluronidaz ve seks feromonlarıdır (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017).

Bu çalışmada, geleneksel peynir örneklerinden izole edilen YSAD 25 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* olmak üzere toplam 54 *Enterococcus* suşunda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda izolatlarda jelatinaz aktivitesi ve hemolitik aktivite fenotipik, virülens faktörleri determine eden *gelE*, *efaAfm*, *efaAfs*, *espfm*, *espsf*, *cdp*, *cob*, *cef*, *cad*, *ace*, *acm*, *agg*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *hyl* genlerinin varlığı ise genotipik olarak araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Enterokok izolatları ve besiyerleri

Çalışma kapsamında Özdemir (2018) tarafından 500 µg/mL gentamisin veya 2000 µg/mL streptomisin içeren de Man Rogosa Sharpe (MRS, LAB M Ltd., Lancashire, UK) agar ve Enterococcosel agar (Becton Dickinson, Almanya) besiyeri ortamları kullanılarak peynir örneklerinden izole edilmiş ve cins ve türe özgü primer çiftleri kullanılarak moleküler düzeyde tanısı yapılmış 18 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* izolatının yanı sıra cins düzeyinde tanısı yapılmış ancak türe özgü primerler ile tanısı yapılamamış 7 *Enterococcus* spp. izolatu olmak üzere toplam 54 YSAD *Enterococcus* izolatu kullanılmıştır. Enterokok kültürleri, MRS broth besiyerine % 15 (v/v) steril gliserol ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için MRS broth besiyerlerinde 37 °C'de 18 saat geliştirilen YSAD enterokok kültürlerinden 0.5 mL alınmış ve Eppendorf tüplerinde 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor no: 12148, Almanya) edilmiştir. Daha sonra hücre çökeltisi 0.5 mL liziz tamponu ile çözülmüş ve 37 °C'de 30 dakika su banyosunda (Nüve NB9, Türkiye) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (% 10, w/v) çözeltisi ilave edilmiş ve su banyosunda (Daihan WB-22, Kore) 80 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Hücre lizatı üzerine 0.7 mL fenol-kloroform karışımı ilave edilmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir Eppendorf tüpüne alınmış, 0.7 mL 2-propanol ilave edilmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 50 µL Tris-EDTA tampon (pH 8.0) ile çözülmüştür (Cancilla vd., 1992). Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin agaroz jel elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde 85 voltta 1.5 saat süreyle yapılmıştır. Jeller 0.2 µg/mL etidyum bromid (Amresco Inc., Solon, OH, ABD) içeren çözeltide boyanmış ve UV transilluminator (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) üzerinde incelenmiştir. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp., Japonya) kullanılmıştır.

Enterococcus spp. izolatlarının tür düzeyinde tanısı

Özdemir (2018) tarafından türe özgü primer çiftleri ile tanısı yapılamamış 7 *Enterococcus* spp. (RS21.3, RS25.3, RS29.1, RG22.4, RG26.1, RG26.2 ve RG26.3) izolatının tür düzeyinde tanısı bu çalışma kapsamında 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasında Edwards vd. (1989) tarafından önerilen pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' primer çifti kullanılmıştır. PZR işlemi 50 µL PZR karışımı kullanılarak (25 µL PCR master mix (2X) (Thermo Scientific #K0172, ABD), 20 µL nükleaz içermeyen su, 3 µL kalıp DNA ve 1'er µL ileri ve geri primer) TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazında

(Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) gerçekleştirilmiştir. PZR işleminde 94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 94 °C'de 30 saniye / 55 °C'de 60 saniye / 72 °C'de 90 saniye çoğaltma (30 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol kullanılmıştır. PZR fragmentlerinin elektroforezi % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış, etidyum bromid içeren çözeltide boyanmış ve UV ışık üzerinde fotoğraflanmıştır. Amplikon büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bç Plus DNA marker (Thermo #SM1153) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. (ODTÜ, Teknokent, Ankara, Türkiye)'inde yaptırılmıştır. Sekans işleminde Applied Biosystems® AB 3730XL (Thermo) otomatik gen sekans cihazı kullanılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST algoritması kullanılarak tespit edilmiştir.

Jelatinaz aktivitesi

Jelatinaz aktivitesi % 3 (w/v) jelatin (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilmiş Todd-Hewitt agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) besiyeri ortamında test edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonu takiben Petri kutuları +4 °C'de 5 saat buzdolabında tutulmuştur. Süre sonunda koloni etrafında bulanık zon oluşumu jelatinaz aktivitesinin pozitif olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001). Denemelerde jelatinaz pozitif *Enterococcus faecalis* NYE7 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (İnoğlu ve Tuncer, 2013).

Hemolitik aktivite

Enterokok izolatlarının hemolitik aktivitesi % 5 (v/v) koyun kanı içeren Columbia agar (Liofilchem) besiyeri ortamında test edilmiştir. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda gelişen kolonilerin etrafında berrak zon oluşumu β-, bulanık yeşilimsi zon oluşumu α- ve zon oluşmaması ise γ-hemolitik reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Cariolato vd., 2008). Denemelerde β-hemolitik *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Virülens genlerin tespiti

YSAD enterokok izolatlarında adhezin kollojen (*ace*), agregasyon maddesi (*agg*), hücre duvarı adhezinleri (*efaA_{fs}*, *efaA_{fm}*), hiyaluronidaz (*hyl*), jelatinaz (*gelE*), kollojen bağlayan protein (*ace*, *acm*), seks feromonları (*cpf*, *cob*, *cpd*, *cad*), sitolizin (*cylM*, *cylB*, *cylA*) ve ekstraselüler yüzey proteini (*esp_{fs}*, *esp_{fm}*) kodlayan virülens faktör genlerinin varlığı Çizelge 1’de verilen primer çiftleri kullanılarak PZR ile araştırılmıştır. *acm*, *agg*, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *cdp*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cob*, *cef*, *cad*, *ace*, *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerinin varlığı 95 °C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C’de 30 saniye / 54 °C (*acm* geni için 52 °C, *agg* geni için 56 °C)’de 30 saniye / 72 °C’de 60 saniye çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C’de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol

uygulanarak TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazı ile araştırılmıştır. Hiyaluronidaz geninin (*hyl*) PZR ile varlığının tespitinde ise 95 °C’de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C’de 30 saniye / 56 °C’de 90 saniye / 72 °C’de 90 saniye çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C’de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Jeller etidyum bromid içeren çözeltide boyanmış, UV ışık üzerinde fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklükleri O’GenelRuler™ 100 bç Plus DNA marker (Thermo) kullanılarak hesaplanmıştır. Denemede *E. faecalis* ATCC 29212 suşu (*agg*⁺, *cpd*⁺, *cop*⁺, *cef*⁺, *cad*⁺, *efaA_{fs}*⁺, *gelE*⁺, *cylM*⁺, *cylA*⁺, *esp_{fs}*⁺) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1. Virülens genlerin tespitinde kullanılan PZR primerleri ve ürün büyüklükleri

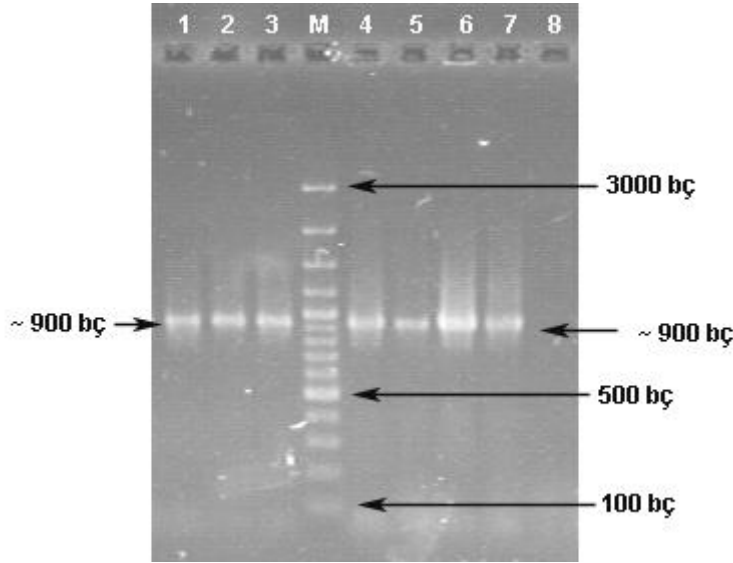
Table 1. PCR primers for detection of virulence genes and product sizes

| Gen <i>Gene</i> | Primer sekansları (5' - 3') <i>Primer sequences (5' - 3')</i> | Ürün büyüklüğü (bç) <i>Product size (bp)</i> | Kaynak <i>Reference</i> |
|--------------------------|--|---|----------------------------|
| <i>gelE</i> | ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC | 419 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>efaA_{fm}</i> | AAC AGA TCC GCA TGA ATA CAT TTC ATC ATC TGA TAG TA | 735 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>efaA_{fs}</i> | GAC AGA CCC TCA CGA ATA AGT TCA TCA TGC TGT AGT A | 705 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>esp_{fm}</i> | TTG CTA ATG CAA GTC ACG TCC GCA TCA ACA CTT GCA TTA CCG AA | 955 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>esp_{fs}</i> | TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA | 933 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cpd</i> | TGG TGG GTT ATT TTT CAA TTC TAC GGC TCT GGC TTA CTA | 782 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cob</i> | AAC ATT CAG CAA ACA AAG C GCG TCA TAA AGA GTGGTC AT | 1405 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cef</i> | GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT | 543 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cad</i> | TGC TTT GTC ATT GAC AAT CCG ACT TTT TCC CAA CCC CTC AA | 1299 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>ace</i> | AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC TCT ATC ACA TTC GGT TGC G | 350 | Ben Belgacem vd., 2010 |
| <i>acm</i> | GGC CAG AAA CGT AAC CGA TA CGC TGG GGA AAT CTT GTA AA | 353 | Camargo vd., 2006 |
| <i>agg</i> | AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA | 1553 | Eaton ve Gasson, 2001 |
| <i>cylM</i> | CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT | 742 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cylB</i> | ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC | 843 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>cylA</i> | TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA | 517 | Reviriego vd., 2005 |
| <i>hyl</i> | ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA | 276 | Vankerckhoven vd., 2004 |

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yedi YSAD *Enterococcus* spp. izolatının tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. pA ve pE' primer çifti kullanılarak yapılan PZR denemesi sonucu izolatların yaklaşık 900 bç büyüklüğünde ampikonlar verdiği belirlenmiştir (Şekil 1). 16S rRNA gen bölgesi

dizilerinin BLAST programında analiz edilmesi sonucu 7 izolatın tamamının *E. faecalis* türü üyesi olduğu belirlenmiştir. 16S rDNA dizi analizinden elde edilen sonuç doğrultusunda çalışma kapsamında 25 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* olmak üzere toplam 54 YSAD enterokok izolatı kullanılmıştır.



Şekil 1. YSAD *Enterococcus* spp. İzolatlarında 16S rRNA Geninin PZR Amplifikasyonu

1: RS21.3; 2: RS25.3; 3: RS29.1; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 4: RG22.4; 5: RG26.1; 6: RG26.2; 7: RG26.3; 8: negatif kontrol (su)

Figure 1. PCR Amplification of 16S rRNA Gene in HLAR *Enterococcus* spp. Isolates

1: RS21.3; 2: RS25.3; 3: RS29.1; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 4: RG22.4; 5: RG26.1; 6: RG26.2; 7: RG26.3; 8: negative control (water)

YSAD enterokok izolatlarının virülens faktörlerinin fenotipik olarak belirlenmesinde jelatinaz ve hemolitik aktivite testleri yapılmıştır. 54 YSAD enterokok izolatı arasında yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarının jelatinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Jelatinaz enterokok suşları tarafından üretilen ve jelatin, kollajen, kazein, hemoglobin, insülin ve bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen hücre dışı metalloendopeptidazdır (Su vd., 1991). Enterokok suşlarında jelatinaz üretiminin genellikle nozokomiyal, fekal ve klinik izolatlarda daha sık rastlanılan bir virülens faktör olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2009; Consentino vd., 2010). Ancak, jelatinaz üretim özelliğine sahip gıda kaynaklı enterokok suşlarının varlığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Eaton ve Gasson, 2001; Franz vd., 2001; Trivedi

vd., 2011; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Domingos-Lopes vd., 2017; Santos vd., 2017).

Hemolitik aktivite testi sonucu, 54 YSAD enterokok izolatının % 48.15'inin (26/54) α -hemolitik, % 46.30'unun (25/54) γ -hemolitik ve % 5.55'inin (3/54) ise β -hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *E. durans* RG22.2, *E. gallinarum* RG46.2 ve *E. faecium* RS74.1 suşlarının β -hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Bakteriyel bir toksin olan hemolizin/sitolizin enterokoklar tarafından salgılanan virülens faktörlerden birisidir. Plazı ya da kromozomal DNA üzerinde kodlu olabilen hemolitik aktivite, enfeksiyon şiddetinin artmasında önemli rol oynamaktadır. β -hemolitik

aktivite daha çok *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin klinik izolatlarında görülmektedir. Gıdalardan β -hemolitik aktiviteye sahip enterokokların izole edilmesi istenilen bir durum değildir (Semedo vd., 2003). β -hemolitik aktivite gösteren enterokok suşlarının fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları önerilmemektedir (Fifadara vd., 2003; Gomes vd., 2008). Farklı araştırmacılar

tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokoklar arasında β -hemolitik aktivitenin görülmediği ya da α - veya γ - hemolitik aktiviteye nazaran daha düşük sıklıkla gözlemlendiği bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Domingos-Lopes vd., 2017; Gök Charyyev vd., 2019).

Çizelge 2. YSAD enterok suşlarının aminoglikozid direnç paternleri, jelatinaz aktiviteleri, hemolitik aktiviteleri ve virülens faktör genleri

Table 2. *Aminoglycoside resistance patterns, gelatinase activities, hemolytic activities and virulence factor genes of HLAAR enterococci strains*

| Bakteriler <i>Bacteria</i> | Aminoglikozid direnç ¹ <i>Aminoglycoside resistance¹</i> | Jelatinaz aktivitesi/ Hemolitik aktivite <i>Gelatinase activity/ Hemolytic activity</i> | Virülens faktör genleri <i>Virulence factor genes</i> |
|-------------------------------|---|---|---|
| <i>E. faecium</i> RS12.1 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_βm, efaA_β, ccf, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS21.1 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS21.2 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS21.3 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS21.4 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. durans</i> RG22.1 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, ccf, acm, esp_β</i> |
| <i>E. durans</i> RG22.2 | CN, S | -/ β | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecium</i> RG22.3 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_βm, efaA_β, ccf</i> |
| <i>E. faecalis</i> RG22.4 | CN, S | +/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS25.1 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS25.2 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS25.3 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS25.4 | CN, S | -/ α | <i>efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS25.5 | CN, S | -/ α | <i>efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RG26.1 | CN, S | +/ γ | <i>gelE, efaA_β, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecalis</i> RG26.2 | CN, S | +/ α | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RG26.3 | CN, S | -/ γ | <i>efaA_β, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.1 | CN, S | -/ α | <i>efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β, cylA, cylB</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.2 | CN, S | -/ γ | <i>efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β, cylA, cylB, agg</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.3 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β, agg</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.4 | CN, S | -/ γ | <i>efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, acm, esp_β, cylA, agg</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.5 | CN, S | -/ γ | <i>efaA_β, cpd, cob, ace, esp_β, cylA, agg</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS27.6 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, esp_β, cylA, agg</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS29.1 | CN, S | -/ γ | <i>efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. faecium</i> RS32.1 | CN, S | -/ α | <i>efaA_βm, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RS32.2 | S | -/ α | - |
| <i>E. faecalis</i> RS32.3 | S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i> |
| <i>E. durans</i> RS32.4 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, ccf</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS32.5 | S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, esp_β</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS32.6 | S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i> |
| <i>E. faecium</i> RS36.1 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RS36.2 | S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS36.3 | CN, S | -/ γ | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS36.4 | CN, S | -/ α | <i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, esp_β</i> |

¹CN: Gentamisin, S: streptomisin.

¹CN: *Gentamicin*, S: *streptomycin*.

Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklar

Çizelge 2. devam
Table 2. continue

| Bakteriler <i>Bacteria</i> | Aminoglikozid direnç ¹ <i>Aminoglycoside resistance¹</i> | Jelatinaz aktivitesi/ Hemolitik aktivite <i>Gelatinase activity/ Hemolytic activity</i> | Virülens faktör genleri <i>Virulence factor genes</i> |
|-------------------------------|---|---|--|
| <i>E. faecium</i> RG36.1 | CN, S | -/α | <i>gelE, efaA_{fm}, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS42.1 | CN, S | -/α | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS42.2 | CN, S | -/α | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS42.3 | CN, S | -/α | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS46.1 | CN, S | -/α | <i>acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS46.2 | CN, S | -/α | <i>efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS46.3 | CN, S | -/α | <i>efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. gallinarum</i> RG46.1 | CN, S | -/α | <i>acm, hyl</i> |
| <i>E. gallinarum</i> RG46.2 | CN, S | -/β | <i>ccf, acm, hyl</i> |
| <i>E. durans</i> RS50.1 | CN, S | -/γ | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RG52.1 | CN, S | -/γ | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RG52.2 | CN, S | -/α | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RG53.1 | CN, S | -/α | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm, hyl</i> |
| <i>E. faecium</i> RG53.2 | CN, S | -/α | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, acm, esp_{fm}, esp_{fs}</i> |
| <i>E. faecalis</i> RS62.1 | CN, S | -/γ | <i>gelE, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm, esp_{fs}</i> |
| <i>E. faecium</i> RG73.1 | CN, S | -/γ | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RS74.1 | CN, S | -/β | <i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RS74.2 | CN, S | -/α | <i>gelE, efaA_{fm}, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm</i> |
| <i>E. durans</i> RS85.1 | CN, S | -/γ | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |
| <i>E. faecium</i> RS88.1 | CN, S | -/γ | <i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i> |

¹CN: Gentamisin, S: streptomisin.

¹CN: *Gentamicin*, S: *Streptomycin*.

YSAD enterokok izolatlarında virülens faktör genlerinin genotipik olarak tespiti, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cdp*, *cob*, *ccf*, *cad*, *ace*, *acm*, *agg*, *cytM*, *cytB*, *cytA* ve *hyl* genlerine özgü primer çiftleri kullanılarak PZR ile yapılmıştır. PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok izolatının % 61.11'inin (33/54) *gelE* geni içerdiği tespit edilmiştir. Franz vd. (2001), peynirden izole edilen enterokok suşlarında yüksek jelatinaz üretim özelliğinin bulunmasını peynirin proteince zengin bir kaynak olmasından ileri gelebileceğini belirtmiştir. Enterokokların ürettikleri bu proteinaz sayesinde gelişmeleri için gerekli olan amino asit kaynağını sağladıklarını bildirmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen bulgular bu düşüncüyü destekler niteliktedir. *E. faecalis* izolatlarında *gelE* geni bulunma sıklığı % 68.00 (17/25), *E. faecium* izolatlarında % 46.67 (7/15) ve *E. durans* izolatlarında % 75 (9/12) olduğu saptanmıştır. *E. gallinarum* izolatlarında *gelE* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokok suşlarında sıklıkla *gelE* geni varlığı

bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Cariolato vd., 2008; Özmen Toğay vd., 2010; Inoğlu ve Tuncer, 2013). Diğer taraftan, Yousif vd. (2005), geleneksel bir Afrika fermente gıda maddesi olan Hussuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşlarının hiçbirinin *gelE* geni içermediğini rapor etmişlerdir. Süt ve ürünleri orijinli enterokok suşlarının kullanıldığı bir başka çalışmada da *E. faecium* suşlarından hiçbirinde *gelE* geni tespit edilmemiştir (De Perio, 2006). Trivedi vd. (2011), süt, et ve meyve-sebze ürünleri gibi farklı gıda maddelerinden izole ettikleri 250 enterokok suşu içerisinde bir *E. faecium* ve bir *E. faecalis* suşu hariç hiçbirinin *gelE* geni içermediğini bildirmişlerdir. Enterokok suşlarının jelatinaz aktiviteleri ve *gelE* geni varlığı birlikte incelendiği zaman yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarında *gelE* geni varlığının yanı sıra jelatinaz aktivitesinin de görüldüğü tespit edilmiştir. PZR denemeleri sonucu *gelE* geni içerdiği tespit edilen 30 enterokok suşunda ise fenotipik olarak *gelE* geninin ifade edilmediği (sessiz) tespit edilmiştir. Benzer olarak farklı

araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da enterokok suşlarında sessiz *gelE* geni varlığı rapor edilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Cariolato vd., 2008; Ben Belgacem vd., 2010; Trivedi vd., 2011; Gök Charyyev vd., 2019).

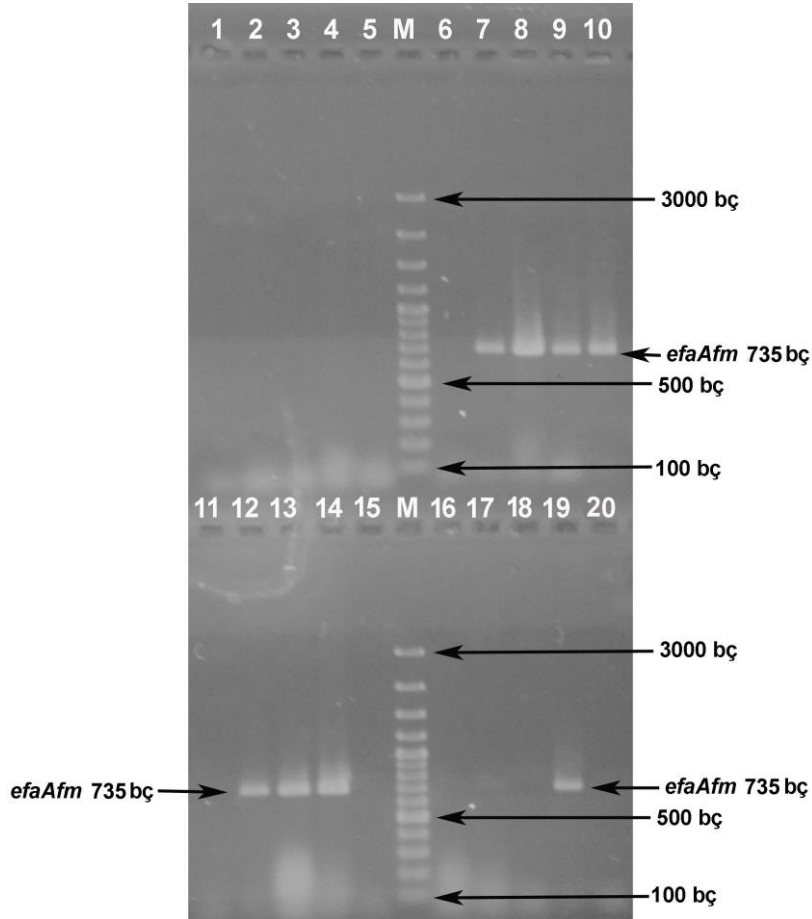
efaA_{fm} ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu izolatların % 88.88'inin (48/54) *efaA_{fs}* ve % 20.37'sinin (11/54) ise *efaA_{fm}* geni (Şekil 2) içerdiği tespit edilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokok suşlarında *efaA_{fm}* ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığı gösterilmiştir (Reviriego vd., 2005; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Abouelnaga vd., 2016). YSAD *E. faecalis* izolatlarının tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiği saptanmıştır. Elde edilen bu bulguya benzer olarak Eaton ve Gasson (2001), starter *E. faecalis* suşlarının tamamının ve gıda izolatu *E. faecalis* suşlarının ise % 89'unun *efaA_{fs}* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Cariolato vd. (2008), *E. faecalis* suşlarının tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Farklı gıda örneklerinden (et ürünü, peynir, süt ve sebze) izole edilen *E. faecalis* suşlarının yer aldığı başka bir çalışmada 80 *E. faecalis* suşundan % 98.7'sinin *efaA_{fs}* geni içerdiği belirlenmiştir (Gomes vd., 2008). Barbosa vd. (2010), 76 *E. faecalis* suşunun tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan Trivedi vd. (2011), süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında daha düşük sıklıkla (% 41.1) *efaA_{fs}* geni bulunduğunu rapor etmişlerdir. *E. faecium* izolatlarının % 73.33'ünde (11/15) *efaA_{fm}* geni varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara benzer olarak Eaton ve Gasson (2001), 11 *E. faecium* suşundan 9'unun *efaA_{fm}* geni içerdiğini bildirmiştir. Yousif vd. (2005), Husuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşunun % 90.9'unun *efaA_{fm}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Cariolato vd. (2008), süt ve süt ürünlerinden izole edilen 25 *E. faecium* suşunun tamamının *efaA_{fm}* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan iki farklı çalışmada ise fermente sosis, peynir ve zeytin örneklerinden izole edilen 16 *E. faecium* suşundan % 67'sinin (Özmen Toğay vd., 2010) ve Tulum peynirinden izole edilen bakteriyosin üreticisi 3 *E. faecium* suşunun tamamının *efaA_{fm}* geni içerdiği (Özden Tuncer vd., 2013) rapor edilmiştir. Diğer taraftan Ben Belgacem vd. (2010), starter kültür

kullanılmadan üretilen geleneksel Tunus fermente et ürününden izole ettikleri *E. faecium* suşlarının yalnız % 20.8'inin *efaA_{fm}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Çalışma kapsamında kullanılan 12 *E. durans* suşu içerisinde hiçbirinin *efaA_{fm}* geni içermediği tespit edilirken, 10'unun (RG22.1, RG22.2, RS36.3, RS42.1, RS42.2, RS42.3, RS46.2, RS46.3, RS50.1 ve RS85.1) *efaA_{fs}* geni içerdiği saptanmıştır (Çizelge 2). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda orijinli *E. durans* suşlarında *efaA_{fs}* geni varlığı rapor edilmiştir (De Perio vd., 2006; Dworkin vd., 2006). PZR ile *efaA_{fm}* ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığının araştırıldığı enterokok izolatları içerisinde 10 *E. faecium* (RS12.1, RG22.3, RG36.1, RG52.1, RG52.2, RG53.1, RG53.2, RG73.1, RS74.1 ve RS74.2) suşunun her iki geni de içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). *E. faecium* suşları içerisinde hem *efaA_{fm}* hem de *efaA_{fs}* geni bulundurma oranı % 66.6 olarak tespit edilmiştir. *E. faecalis* suşları arasında her iki geni de içeren bir suşa rastlanılmamıştır. Adhezin benzeri *E. faecalis* ve *E. faecium* endokarditis antijenleri potansiyel virülens faktörler olarak nitelendirilmektedir. *efaA_{fs}* geninin patojenite üzerine etkisi hayvan modellerinde tespit edilmiş ancak *efaA_{fm}* geninin patojenite üzerindeki rolü henüz belirlenmemiştir (Dworkin vd., 2006; Cariolato vd., 2008; Ben Belgacem vd., 2010). Bu nedenle çalışma kapsamında *efaA_{fs}* geni içerdiği tespit edilen YSAD enterokok izolatlarının tüketici sağlığı açısından risk teşkil etme potansiyeli bulunmaktadır.

YSAD enterokok izolatlarında seks feromon (*cdp*, *cob*, *ccf* ve *cad*) genlerinin varlığının araştırıldığı PZR çalışmaları sonucu izolatların % 88.89'unda (48/54) *ccf*, % 51.85'inde (28/54) *cdp* ve % 9.26'sında (5/54) *cob* geni varlığı saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *cad* geni varlığı tespit edilmemiştir. *ccf* geni bulunma sıklığı *E. faecalis* için % 94.44 (23/25), *E. durans* için % 91.66 (11/12), *E. faecium* için % 86.6 (13/15) ve *E. gallinarum* için ise % 50 (1/2) olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarının % 92'sinde (23/25), *E. faecium* izolatlarının % 20'sinde (3/15) ve *E. durans* izolatlarının % 16.67'sinde (2/12) *cdp* geni varlığı belirlenmiştir. *E. gallinarum* suşlarında ise *cdp* geni tespit edilmemiştir. Enterokok izolatlarında *cob*

geni bulunma sıklığı % 9.2 olarak saptanmıştır. *cob* geni varlığı sadece *E. faecalis* RS27.4, RS27.5, RS27.6 ve RS32.5 suşlarında tespit edilmiştir. Seks feromonları, enterokok suşları arasında plazmid DNA'nın konjugatif transferini kolaylaştıran küçük hidrofobik peptitlerdir. Seks feromonları virülens faktör olarak değerlendirilmemelerine

rağmen, enterokok suşlarında seks feromonlarının üretimi virülens determinantların ve antibiyotik direncin feromon yanıt veren konjugatif plazmidler aracılığı ile diğer enterokok suşlarına yayılmasını teşvik etmektedir (Eaton ve Gasson, 2001; Klare vd., 2003; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017).



Şekil 2. Bazı YSAD *Enterococcus* Suşlarında *efaA_{fm}* Geninin PZR Amplifikasyonu

1: *E. durans* RS46.1; 2: *E. durans* RS46.2; 3: *E. durans* RS46.3; 4: *E. gallinarum* RG46.1; 5: *E. gallinarum* RG46.2; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 6: *E. durans* RS50.1; 7: *E. faecium* RG52.1; 8: *E. faecium* RG52.2; 9: *E. faecium* RG53.1; 10: *E. faecium* RG53.2; 11: *E. faecalis* RS62.1; 12: *E. faecium* RG73.1; 13: *E. faecium* RS74.1; 14: *E. faecium* RS74.2; 15: *E. durans* RS85.1; 16: *E. faecium* RS88.1; 17: *E. faecalis* ATCC 29212 (negatif kontrol); 18: *E. faecalis* ATCC 51299 (negatif kontrol); 19: *E. faecium* ATCC 51599 (pozitif kontrol); 20: negatif kontrol (su)

Figure 2. PCR Amplification of *efaA_{fm}* Gene in Some HILAR *Enterococcus* Strains

1: *E. durans* RS46.1; 2: *E. durans* RS46.2; 3: *E. durans* RS46.3; 4: *E. gallinarum* RG46.1; 5: *E. gallinarum* RG46.2; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 6: *E. durans* RS50.1; 7: *E. faecium* RG52.1; 8: *E. faecium* RG52.2; 9: *E. faecium* RG53.1; 10: *E. faecium* RG53.2; 11: *E. faecalis* RS62.1; 12: *E. faecium* RG73.1; 13: *E. faecium* RS74.1; 14: *E. faecium* RS74.2; 15: *E. durans* RS85.1; 16: *E. faecium* RS88.1; 17: *E. faecalis* ATCC 29212 (negative control); 18: *E. faecalis* ATCC 51299 (negative control); 19: *E. faecium* ATCC 51599 (positive control); 20: negative control (water)

esp_{fm} ve *esp_f* genlerinin varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok suşundan 27'sinin (% 50) *esp_f* geni içerdiği tespit edilmiştir. *esp_{fm}* geni varlığı ise sadece *E. faecium* RG53.2 suşunda belirlenmiştir. *E. faecium* RG53.2 suşunun aynı zamanda her iki *esp* genini de içeren tek suş olduğu saptanmıştır. *E. gallinarum* suşlarının hiçbirinde (0/2) *esp* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). *esp_f* geninin *E. faecalis* suşlarında, *E. faecium* ve *E. durans* suşlarına nazaran daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. *esp_f* geni bulunma sıklığının *E. faecalis* suşlarında % 94.44 (23/25), *E. durans* ve *E. faecium* suşlarında ise sırasıyla % 16.67 (2/12) ve % 13.33 (2/15) olduğu saptanmıştır. Geçmiş yıllarda gıda kaynaklı enterokok suşlarının kullanıldığı çalışmalarda elde edilen bulguların aksine YSAD enterokok suşlarında *esp* geni bulunma sıklığı yüksek bulunmuştur. Eaton ve Gasson (2001), gıda kökenli *E. faecium* suşlarının hiçbirinin, *E. faecalis* suşlarının ise % 33'ünün *esp* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Franz vd. (2001), 48 *E. faecium* suşundan sadece 1'inin (% 2.1) *esp* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının % 57'sinde ve *E. faecium* suşlarının ise % 4.8'inde *esp* geni varlığı tespit edilmiştir (İnoğlu ve Tuncer, 2013). Enterokok suşlarında ekstraselüler yüzey proteini üretimi hücre hidrofobitesini, abiyotik yüzeylere tutunmayı ve biofilm oluşumunu arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar yüzey proteini varlığı ile antibiyotik direnci arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017). Ekstraselüler yüzey proteini üreten enterokok suşlarının gıdalarda starter kültür olarak kullanımı istenilmemektedir (Franz vd., 2001). Bu nedenle *esp* geni içerdiği tespit edilen 23 *E. faecalis* ve bir *E. faecium* suşunun tüketici sağlığı açısından risk oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.

PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok suşu arasından 5 (% 9.26) *E. faecalis* suşunun *agg* genini içerdiği tespit edilmiştir. *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının hiçbirinde *agg* geni varlığı belirlenmemiştir (Çizelge 2). Eaton ve Gasson (2001), Pérez-Pulido vd. (2006) ve Ben Belgacem vd. (2010) tarafında yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. durans* suşlarında *agg* geni varlığı tespit

edilmemiştir. Diğer taraftan, gıda kaynaklı *E. faecium* suşlarında *agg* geni varlığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Semedo vd., 2003; İnoğlu ve Tuncer, 2013). Çalışma kapsamında *agg* geni içerdiği tespit edilen *E. faecalis* RS27.2, RS27.3, RS27.4, RS27.5 ve RS27.6 suşlarının tamamının aynı zamanda seks feromon geni de içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 2). Eaton ve Gasson (2001) da *agg* geni içeren suşların mutlaka seks feromon determinantlarını da içerdiğini bildirmiştir.

ace ve *acm* genlerinin araştırıldığı PZR denemeleri sonucu 25 *E. faecalis* suşundan 20'sinin *ace* geni içerdiği, *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının ise hiçbirinin *ace* geni içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 2). *E. faecalis* suşlarının % 64'ünün (16/25), *E. faecium* suşlarının % 86.67'sinin (13/15), *E. durans* suşlarının % 91.67'sinin (11/12) ve *E. gallinarum* suşlarının tamamının (2/2) *acm* geni içerdiği tespit edilmiştir. Enterokok suşlarında *ace* geni bulunma sıklığı % 37.04 (20/54) ve *acm* geni bulunma sıklığı ise % 77.78 (42/54) olarak hesaplanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da gıda kökenli enterokok suşlarında adhezin kollojen determine eden genlerin varlığı gösterilmiştir (Pérez-Pulido vd., 2006; Gomez vd., 2008; Trivedi vd., 2011). Diğer taraftan Ben Belgacem vd. (2010) ve İnoğlu ve Tuncer (2013) gıda kaynaklı enterokok suşlarında *ace* geni varlığını tespit etmediklerini rapor etmişlerdir.

Sitolizin (*cyLM*, *cyLB* ve *cyLA*) genlerinin araştırıldığı PZR denemeleri sonucu *E. faecalis* RS27.1 ve RS27.2 suşlarında *cyLB* ve *E. faecalis* RS27.1, RS27.2, RS27.4, RS27.5 ve RS27.6 suşlarında ise *cyLA* geni varlığı tespit edilirken, hiçbir suşta *cyLM* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). Enterokok suşlarında *cyLB* geni bulunma sıklığı % 3.7, *cyLA* geni bulunma sıklığı ise % 9.2 olarak saptanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında *cyLM*, *cyLB* ve *cyLA* geni varlığı bildirilmiştir (Pérez-Pulido vd., 2006; Ben Belgacem vd., 2010; Trivedi vd., 2011). Diğer taraftan, Eaton ve Gasson (2001) gıda kökenli *E. faecium* suşlarının hiçbirinin sitolizin geni içermediğini ancak, bazı *E. faecalis* suşlarının ise her üç geni de içerdiğini

bildirmişlerdir. Yousif vd. (2005) Hussuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşundan hiçbirinin sitolizin geni içermediğini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Türkiye'de Tulum peynirinden izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarından hiçbirinin sitolizin geni içermediği bildirilmiştir (Inoğlu ve Tuncer, 2013).

Hiyaluronidaz (*hyl*) geni varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu *E. gallinarum* RG46.1, RG46.2 ve *E. faecium* RG53.1 suşlarında *hyl* geni varlığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarının hiçbirinde ise *hyl* geni varlığı saptanmamıştır (Çizelge 2). Enterokok suşlarında *hyl* geni bulunma sıklığı % 5.5 (3/54) olarak hesaplanmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise 116 klinik *E. faecium* ve *E. faecalis* suşunun % 12.9'unun *hyl* geni içerdiği bildirilmiştir (Saba vd., 2016).

SONUÇ

Bu çalışmada, peynir örneklerinden izole edilmiş 54 YSAD enterokok suşunda virülens faktör varlığı fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılmıştır. PZR denemeleri sonucu *E. faecium* RS32.2 suşu hariç tüm YSAD enterokok izolatlarında en az bir virülens faktör geni varlığı tespit edilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının yüksek seviyede aminoglikozid direncinin yanı sıra çok sayıda virülens faktör geni içermeleri tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır. Bu sonuçlar fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılacak enterokok suşlarının seçiminde endüstriyel özelliklerinin yanı sıra dikkatli bir güvenlik değerlendirmesi gerektirdiğini de ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 5085-YL1-17 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz. Degnide Ephrem Adifon yüksek lisans eğitimi sürecinde maddi olarak Benin Bursları Ulusal Müdürlüğü ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abouelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M. (2016). Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Ann Microbiol*, 66, 577-585.
- Avcı, M., Özden-Tuncer, B. (2017). Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. *Pol J Microbiol*, 2, 223-233.
- Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal. *Food Control*, 21, 651-656.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A., Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Bismuth, R., Courvalin, P. (2010). Aminoglycosides and Gram-positive bacteria. In *Antibiogram*, Courvalin, P., Leclercq, R. Rice, L. (eds), ESKA, Portland, Oregon, the USA, pp. 225-242.
- Camargo, I.L.B.C., Gilmore, M.S., Darini, A.L.C. (2006) Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect*, 12, 1123-1130
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1772-1775.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and

- human samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.
- Chajęcka-Wierzychowska, W., Zandernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Sci Technol*, 75, 670-676.
- Chajęcka-Wierzychowska, W., Zandernowska, A., Zarzecka, U., Zakrzewski, A., Gajewska, J. (2019). Enterococci from ready-to-eat food – horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile. *J Sci Food Agric*, 99, 1172-1179.
- Choi, J-M., Woo, G-J. (2013). Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int J Food Microbiol*, 165, 1-6.
- Consentino, S., Podda, G.S., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M., Pisano, M.B. (2010). Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *J Prev Med Hyg*, 1, 31-36.
- De Perio, M.A., Yarnold, P.R., Warren, J., Noskin, G.A. (2006). Risk factors and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 27, 28-33.
- Demirgöl, F., Tuncer, Y. (2017). Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry-fermented sausage. *Korean J Food Sci An*, 37(5), 670-681.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *J Food Microbiol*, 63, 178-190
- Dworkin, M., Briana, K.K., Dunny, G.M. (2006). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity. *Int J Med Microbiol*, 296, 141-147.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1628-1635.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17, 7843-7853.
- Fifadara, N., Radu, S., Hassan, Z., Beuchat, L.R., Rusul, G. (2003). Hemolytic and nonhemolytic vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from beef important to Malaysia. *J Food Prot*, 66(10), 1845-1850.
- Foulquié Moreno, M.R., 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.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4385-4389.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D., De Martinis, E.C. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*, 25, 668-675.
- Gök Charyyev, M., Özden Tuncer, B., Akpınar Kankaya, D., Tuncer, Y. (2019). Bacteriocinogenic properties and safety evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 isolated from boza, a traditional cereal based fermented beverage. *J. Consum. Prot. Food Saf.*, 14(1), 41-53.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front Microbiol*, 9, 1791.
- Inoğlu, Z.N., Tuncer, Y. (2013). Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *J Food Safety*, 33, 369-377.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, 88, 269-290.

- Niu, H., Yu, H., Hu, T., Tian, G., Zhang, L., Guo, X., Hu, H., Wang, Z. (2016). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Braz J Microbiol*, 47, 691-696.
- Ogier, J.C., Seror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*, 126, 291-301.
- Özdemir, R. (2018). Süt ve süt ürünlerinde yüksek seviyede aminoglikozid dirençli *Enterococcus* spp. yaygınlığı ve aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) genlerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 105 s.
- Özden Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y. (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Türk J Biol*, 37, 443-449.
- Özmen Toğay, S., Çelebi Keskin, A., Açıık, L., Temiz, A. (2010). Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J Appl Microbiol*, 109, 1084-1092.
- Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez, M., Galvez, A. (2006). Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol*, 44, 2070-2077.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. (2005). Screening of virulence determinants of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J Hum Lact*, 21, 131-137.
- Reyes, K., Zervos, M., John, J. (2017). Enterococcal infections in adults. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D. (eds), Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2, Springer International Publishing, Berlin, pp. 811-818.
- Saba Çopur Ş., Şahin, F., Göçmen, J.S. (2016). Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and -resistant enterococci isolated from clinical samples. *Türk J Med Sci*, 46(3), 877-891.
- Santos, S.C., Fraqueza, M.J., Elias, M., Barreto, A.S., Semedo-Lemsaddek, T. (2017). Traditional dry smoked fermented meat sausages: characterization of autochthonous enterococci. *LWT-Food Sci Technol*, 79, 410-415
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F.S., Marques, J.J.F., Crespo, M.T.B., Tenreiro, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*, 26, 13-22.
- Singh, K.V., Nallapareddy, S.R., Murray, B.A. (2007). Importance of the *ebp* (endocarditis-and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*, 195, 1671-1677.
- Sparo, M., Delpech, G., Garcia Allende, N. (2018). Impact on public health of the spread on high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. *Front Microbiol*, 9, 3073.
- Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Makinen, K.K., Makinen, P.L., Fiedler, S., Wirth, R., Clewell, D.B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun*, 59, 415-420.
- Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med Czech*, 56, 352-357.
- Vankerkhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4473-4479.
- Yogurtcu, N.N., Tuncer, Y. (2013). Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains

isolated from Turkish tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 66, 236-242.

Yousif, N.M.K., Dawyndt, P, Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swing, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. *J Appl Microbiol*, 98, 216-228.

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.