

Hledání vhodných molekulárních markerů pro rozlišení různých druhů enterokoků

ŠÁRKA BOBKOVÁ, DANA BAUDIŠOVÁ

Klíčová slova: *Enterococcus* – fekální znečištění – molekulární markery – trasování původu mikroorganismů (MST)

SOUHRN

Enterokoky patří spolu se zástupci druhu *Escherichia coli* mezi tzv. indikátory fekálního znečištění, které se používají při hodnocení mikrobiologické kvality koupacích vod. Jejich stanovení se řídí vyhláškou MZ ČR č. 238/2011 Sb. a provádí se kultivačně na selektivních agarových médiích. Je známo, že ne všechny druhy enterokoků jsou fekálního původu a mají tedy přímou souvislost s fekálním znečištěním vody. Pro správné hodnocení kvality koupací vody by bylo vhodné znát i původ těchto bakterií. K trasování původu mikroorganismů (tzv. MST, „microbial source tracking“) se s výhodou používá metod molekulární biologie. Pomocí PCR metody lze amplifikaci molekulárních markerů (tj. specifických úseků DNA) odlišit různé druhy enterokoků. Publikací zabývajících se touto tematikou je mnoho, nicméně ve většině studií se k druhovému rozlišení používá pouze jeden marker, a to při práci s přírodními vzorky nemusí být vždy dostatečné. Pro spolehlivou druhovou identifikaci u přírodních vzorků by bylo výhodnější použít kombinaci několika markerů. Zároveň by bylo vhodné aplikovat poznatky získané z experimentů s čistými kulturami na přírodní vzorky koupacích vod, a to jak čistých, tak fekálně znečištěných. Pro praxi by byly důležité i postupy umožňující PCR ze smíšeného přírodního vzorku, tedy bez nutnosti předkultivace na selektivních médiích, aby se maximálně zkrátila doba, za kterou je znám výsledek.

Cílem tohoto příspěvku je přehledně shrnout publikované molekulární markery pro identifikaci jak enterokoků, tak příbuzných mikroorganismů, a zhodnotit jejich možné použití v mikrobiologii vody pro rychlé zařazení zástupců rodu *Enterococcus* do druhů při analýze přírodních vzorků.

CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY ENTEROKOKŮ

Enterokoky jsou gram pozitivní, kataláza negativní koky uspořádané obvykle do krátkých řetízků. Jsou to chemoorganotrofové, jejichž hlavním koncovým produktem při fermentaci cukrů je kyselina mléčná. Ačkoliv fenotypické a biochemické odlišení enterokoků od ostatních bakteriálních druhů je složité, mezi hlavní znaky tohoto rodu patří přítomnost D antigenu, tolerance k vyšším teplotám (až 45 °C) i schopnost růstu v přítomnosti 6,5% NaCl. Při jejich identifikaci v laboratořích se používají selektivní média, na kterých jsou eliminovány ostatní bakteriální druhy (např. SB médium obsahující azid sodný pro potlačení G- tyčků).

Taxonomicky patří mezi *Enterococcaceae* a v současné době zahrnuje tento rod 43 druhů [1]. Typickým zástupcem je *E. faecalis*. Enterokoky se přirozeně vyskytují v trávicím traktu teplokrevných živočichů včetně člověka i v trávicím traktu některých bezobratlých (koryši, šneci) [2, 3] a byly izolovány i z povrchových sladkých i slaných vod, z půdy či z rostlinné vegetace. Některé druhy (např. *E. faecalis*, *E. faecium*) jsou podmíněně patogenní.

Přítomnost enterokoků ve vodě může mít různý původ: buď jsou přirozenou součástí vodního ekosystému a vyskytují se tam volně, nebo mohou být asociovány s rostlinnou vegetací (typicky *E. mundtii*, *E. casseliflavus*) [4, 5], nebo se zooplanktonem [6], případně se mohou do vody dostat z půdy [7]. Dalším zdrojem mohou být odpadní vody či exkrementy živočichů, a to jak obratlovců, tak bezobratlých. Za typické intestinální druhy jsou považovány *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* [8].

Jak je z výše uvedeného výčtu patrné, ke správné interpretaci zvýšené hladiny enterokoků ve vodním prostředí by bylo vhodné znát jejich původ.

Metody, které se používají k vystopování původu určitých organismů v prostředí, se souhrnně nazývají „microbial source tracking“ (MST). Principem těchto metod je, že určité druhy bakterií jsou asociovány s určitými hostiteli či prostředím. U enterokoků jsou např. druhy *E. faecalis*, *E. faecium* považovány za typické intestinální druhy (ačkoliv byly izolovány i z jiných ekosystémů) a naopak *E. mundtii*, *E. casseliflavus* jsou většinou spojeny s rostlinami [9, 10]. Jednou z metod MST je PCR amplifikace určitých (definovaných) úseků DNA (tzv. molekulárních markerů), na jejichž základě je možné rozlišit enterokoky do jednotlivých druhů. V tomto směru existuje značné množství literatury týkající se nejen enterokoků, ale i jiných rodů bakterií, a je možné z toho při hledání vhodných molekulárních markerů vycházet.

MOLEKULÁRNÍ MARKERY PRO MST

Obecná charakteristika molekulárních markerů

Vhodný molekulární marker pro druhové rozlišení bakterií by měl splňovat několik kritérií:

1. měl by být široce rozšířen v genomech bakterií, tj. ve většině bakterií by měl mít ortologní gen,
2. na druhou stranu také musí obsahovat úseky unikátní pro daný druh bez možných paralogních genů,
3. jejich velikosti musí být dostatečné pro možná porovnávání, ale zároveň ne příliš dlouhé, aby se daly celé sekvenovat,
4. sekvence musí být dostatečně reprezentativní, aby postihla spolehlivě charakteristiku genomu daného druhu.

Tabulka 1. Přehled diskutovaných molekulárních markerů
Table 1. Summary of discussed molecular markers

Gen	Produkt genu	Komentář	Reference
Kandidátní geny vzešlé ze studie Zeigler a kol. 2003			
<i>recN</i>	recombinační-opravný protein	vyhodnocen podle in silico analýz jako nejlepší vhodný molekulární marker u enterokoků analyzován v souvislosti s tvorbou biofilmu	Zeigler, D.R. 2003 Frank, K.L. 2013
<i>lig</i>	DNA ligaza		Zeigler, D.R. 2003
<i>dnaX</i>	podjednotka DNA polymerazy III	vhodný pro odlišení druhů s redukovaným genomem	Zeigler, D.R. 2004
<i>glyA</i>	serin hydroxymethyltransferase	není ortologní gen u rodu <i>Mycobacterium</i> použita jako proba při multiplex ligation-dependent probe amplification na odlišení 13 druhů patogenů způsobujících alimentární nákazy	Zeigler, D.R. 2005 So-Young Kim a kol. 2016
<i>cysS</i>	cysteine tRNA synthase		Zeigler, D.R. 2005
<i>thdF</i>	GTP-vázající thiphene oxidaza	použit při LATE-PCR assay na detekci 17 bakteriálních patogenů spojených se sepsí	Zeigler, D.R. 2006, Rice, L.M. a kol. 2013
<i>uvrC</i>	C podjednotka ABC excisazy	není ortologní gen u rodu <i>Chlamidia</i> podílí se na rezistenci k UV	Zeigler, D.R. 2006 Ozawa a kol. 1997
<i>ruvB</i>	A podjednotka helikázy	není ortologní gen u druhu <i>Bacillus anthracis</i>	Zeigler, D.R. 2006
Geny primárního metabolismu			
16SrRNA	16S rRNA	různé části 16S rRNA k odlišení druhů u <i>Bacteroides</i> především odlišení <i>Enterococcus</i> od jiných rodů	Bernhardt a Field 2000, Layton a kol. 2006, Haughland 2010, Mieszcin 2009
23SrRNA	23S rRNA	domena V k odlišení <i>E. faecalis</i> od ostatních druhů enterokoků	Tsiodras, S. a kol. 2000
16S-23S spacer	intergenová oblast mezi 16S a 23S	rozlišení enterokoků do 3 skupin navržených Falklamem a Collinsem	Tyrell a kol. 1997, Facklam a Collins 1989
tRNA space	intergenová oblast mezi tRNA geny	odlišení 9 druhů enterokoků	Baele a kol. 2000
<i>ddl</i>	D-ala: D-ala ligase	odlišení 4 klinicky významných druhů specifický primer pro odlišení <i>E. faecalis</i>	Dutka-Malen 1995 Harwood a kol. 2004, Ozawa a kol. 2000
<i>sodA</i>	superoxid dismutaza Mn závislá	odlišení 23 druhů enterokoků	Jackson a kol. 2004, Layton a kol. 2010
<i>cpn60</i>	chaperonin 60	odlišení 17 druhů enterokoků	Goh a kol. 2000
<i>atpA</i>	alfa podjednotka ATP syntázy	odlišení většiny druhů enterokoků	Naser, S. a kol. 2005
<i>rpoA</i>	RNA polymeraza alfa podjednotka	odlišení většiny druhů enterokoků, použití spolu s <i>pheS</i>	Naser, S. a kol. 2005
<i>pheS</i>	phenyl alanin tRNA syntaza	odlišení většiny druhů enterokoků, použití spolu s <i>rpoA</i>	Naser, S. a kol. 2005
<i>tuf</i>	EF-Tu	odlišení enterokoků od většiny klinicky významných bakterií	Ke, D. 1999
Faktory virulence a geny rezistence			
<i>esp</i>	povrchový protein	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Shannon M. McQuaig a kol. 2006
<i>asaI</i>	povrchový agregující protein	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Edyta Golińska a kol. 2013
<i>gelA</i>	želatinaza	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Edyta Golińska a kol. 2013
<i>vanA</i>	D-ala:D-lak ligaza		
<i>vanB</i>	D-ala:D-lak ligaza	rezistence k vankomycinu, odlišení především rezistentních vs. citlivých klinických izolátů	Evers a kol. 1994, Navarro a Courvalin 1994
<i>vanC</i>	D-ala:D-ser ligaza		

Markery diskutované v tomto příspěvku jsou shrnuty v *tabulce 1*. Zeigler a kolektiv porovnávali ve své práci 44 bakteriálních genomů, reprezentujících 16 rodů, za účelem hledání takových genových oblastí, které by mohly být použity obecně na rozlišení bakteriálních druhů. Z celkových analýz nakonec vyplynulo 8 různých genů (genových oblastí), které splňovaly výše uvedená kritéria [11]. Daná studie nezahrnovala genom enterokoků, avšak pracovala mimo jiné s genomy 4 druhů streptokoků, mezi něž se enterokoky původně řadily. Z navržených 8 kandidátních genů byly 4 (*recN*, *glyA*, *thdF*, *uvrC*) zkoumány i u enterokoků, a to buď v souvislosti s tvorbou biofilmu (*recN*), nebo resistance k UV (*uvrC*) [12, 13]. Geny *glyA* a *thdF* byly použity spolu s jinými geny pro odlišení různých bakteriálních patogenů způsobujících alimentární infekce [14, 15]. Amplifikace *recN* byla použita i pro odlišení několika druhů streptokoků [16]. Tento gen se tedy nabízí jako jeden z několika vhodných kandidátů též k detekci enterokoků.

Skupiny genů vhodných pro MST

GENY KÓDUJÍCÍ KOMPONENTY TRANSKRIPČNÍHO A TRANSLAČNÍHO APARÁTU

Geny, jejichž produkty se podílí na expresi genetické informace, tedy na transkripci a translaci, splňují podmínku přítomnosti ortologů (tj. ve všech mikroorganismech, kde jsou přítomné, plní stejnou funkci) a zároveň též obsahují úseky specifické pro daný druh. Proto také 16S a 23S rDNA byly mezi prvními kandidáty na molekulární markery pro MST. Použitím různých oblastí 16S rDNA jako biologického markeru se zabývalo mnoho skupin, a to nejen u enterokoků [17], ale v souvislosti s MST též u bakterií rodu *Bacteroides* [18, 19]. *Bacteroides* tvoří významnou část střevní mikroflóry teplotokrevných živočichů včetně člověka, a proto o nich také bylo uvažováno jako o možných alternativních indikátorech fekálního znečištění [20, 21]. Na rozdíl od *E. coli* a intestinálních enterokoků jsou ale obtížně kultivovatelné. Jejich zástupci jsou druhově specifičtější pro určité hostitele [22], čehož by bylo možné s výhodou využít právě pro MST. Sekvence 16S rDNA patří stále mezi nejpoužívanější metody pro identifikaci druhů enterokoků, přestože má svoje limity při rozlišení blízké příbuzných druhů, zejména ze skupiny *E. faecium* [23].

Tsiordas s kolegy analyzoval sekvence genu 23S rDNA kódujícího RNA velké podjednotky bakteriálního ribozomu. Použili doménu V 23S rDNA pro odlišení *E. faecalis* od ostatních druhů enterokoků [24].

Později si badatelé všimli, že zatímco geny pro 16S a 23S rRNA jsou fylogeneticky velmi konzervované, intergenové oblasti vykazují větší variabilitu a byly by tedy pro odlišení druhů vhodnější. Na základě srovnání intergenové oblasti mezi 23S a 16S rRNA Tyrell a kolektiv mohli rozlišit enterokoky do tří fylogenetických skupin (I, II, III, navržených dříve Facklamem a Collinsem) [25, 26]. V rámci skupiny II bylo navíc i možné odlišit intestinální druh *E. faecium* od typicky přírodního druhu *E. casseliflavus* a druhu *E. mundtii*. Výhodou tohoto markeru je též fakt, že pro amplifikaci se pro všechny druhy používá jeden pár primerů a jednotlivé druhy se liší velikostí amplifikovaného úseku (úseků).

Obdobně Baele a kolektiv použili intergenovou oblast mezi geny pro tRNA k odlišení devíti druhů enterokoků [27]. Při těchto experimentech použili primery navržené v krajních konzervovaných oblastech tRNA genů, pro amplifikaci oblasti mezi těmito geny. To by mohlo umožnit využití této strategie u mnoha bakteriálních druhů, čemuž nasvědčuje fakt, že obdobná genová oblast byla použita pro druhové rozlišení u streptokoků [28], *Acinetobacter* spp. [29], *Listeria* spp. [30] a stafylokoků [31, 32].

Dalším slibným markerem je gen *rpoA* kódující a podjednotku RNA polymerázy. Bylo ukázáno, že při použití *rpoA* spolu s dalším markerem – *pheS* (gen pro fenylalaninyl-tRNA syntázu) je možné rozlišit 30 druhů enterokoků [33]. Gen *rpoA* byl též mezi kandidátními geny navrženými Zeiglerem a kol. nicméně s menším skóre než výše zmíněných vybraných osm kandidátních genů. Zdá se však, že pro enterokoky by mohl být na odlišení druhů spolehlivě použit.

Podobně lze gen *tufK* kódující elongační faktor Tu využít pro odlišení enterokoků od ostatních klinicky významných bakterií [34]. Je třeba ale podotknout, že navržené primery se vážaly též na sekvence ortologních genů u několika druhů *Listeria* spp. a zástupců rodu *Abiotrophia*.

GENY KÓDUJÍCÍ DALŠÍ PROTEINY PRIMÁRNÍHO METABOLISMU

Poroznost je věnována i genům kódujícím proteiny primárního metabolismu, především genům *ddl*, *sodA*, *atpA* a *cpn60*.

Gen *ddl* kóduje D-ala:D-ala ligázu nezbytnou při syntéze peptidoglykanu. Na rozdíl od amplifikace intergenových oblastí, při použití genu *ddl*, byla použita pro různé druhy různá dvojice primerů. Výsledkem PCR byl potom buď specifický namnožený úsek DNA odpovídající genu daného druhu, nebo žádný produkt. Nevýhodou této metody je, že v případě většího množství druhů znamená identifikace tímto způsobem velké množství jednotlivých PCR reakcí. Použitím *ddl* jako markeru bylo možné rozlišit čtyři druhy enterokoků (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) [35]. Harwood a kolektiv později identifikovali *ddl* úsek, který byl specifický pro odlišení *E. faecalis* od ostatních druhů. Nicméně odlišení druhého typického intestinálního druhu *E. faecium* bylo s tímto markerem dost složité a často ani nekorelovalo s výsledky biochemických testů [36].

Na obdobném principu, tedy navržení dvojice primerů specifických pro daný druh v rámci jednoho genu navrhli Jackson a kolektiv 23 párů primerů pro amplifikaci genu *sodA* kódující superoxidodismutázu závislou na Mn [37]. Tyto primery byly pak použity hromadně v celkem 7 PCR reakcích (multiplex PCR). Layton a kolektiv navíc optimalizovali pozici některých primerů, a tím zvýšili jejich druhovou specifitu [38].

Produkt genu *atpA* je alfa podjednotka ATP syntázy, tedy enzymu zodpovědného za syntézu ATP. Bylo zjištěno, že tímto markerem je možné rozlišit většinu druhů enterokoků. Pomocí *atpA* spolu s *rpoA* a *pheS* bylo možné ještě zvýšit spolehlivost druhového určení a navrhnout kombinaci této trojice markerů spolu s 16S rDNA jako vhodné geny pro typizaci enterokoků [33, 39].

Goh a kolektiv využili degenerovaných primerů k odlišení 17 druhů enterokoků na základě amplifikace genu pro chaperonin (*cpn 60*) [40].

GENY PRO FAKTORY VIRULENCE A ANTIBIOTICKÉ RESISTENCE

Je na místě se domnívat, že intestinální druhy enterokoků se mohou od těch volně v přírodě žijících druhů lišit produkcí faktorů virulence včetně produkce adhesinů. Ačkoliv se původně myslelo, že např. povrchový protein Esp s funkcí adhesinu je specifický pro izoláty *E. faecalis* pocházejících z intestinálního traktu člověka [41], později byl tento protein nalezen i u izolátů ze zvířat či jiných přírodních vzorků [42, 43].

Přítomnost genů pro jiné faktory virulence jako např. pro povrchový agregující protein (*asa 1*) či gen pro želatinázu (*gel E*) se lišila i u klinických izolátů jednoho druhu [44]. Z tohoto důvodu by mohlo být použití těchto genů jako markerů nejednoznačné.

Typicky přírodní druhy enterokoků (*E. casseliflavus* a *E. gallinarum*) jsou, na rozdíl od druhů izolovaných z klinických vzorků, obecně citlivé k antibiotikům. Geny rezistence se často používají jako markery pro odlišení bakteriálních druhů i rezistentních versus citlivých izolátů především v humánní medicíně. K největším současným problémům antibiotické rezistence u enterokoků patří rezistence k vankomycinu, který byl dlouho podáván při infekcích multirezistentními kmeny především u hospodářských zvířat. Vankomycin inhibuje syntézu peptidoglykanu, na jehož syntéze se mimo jiných podílí též výše diskutovaná D-ala:D-ala ligáza (gen *ddl*). Geny, jejichž produkty jsou zodpovědné za rezistenci k vankomycinu, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, a *vanC2* jsou příbuzné k *ddl* [35, 45, 46]. Proti vankomycin rezistentním enterokokům se v současné době používá antibiotikum linezolid inhibující proteosyntézu. Na rezistenci k linezolidu se podílí produkty genů *cfp* kódující ribozom modifikující enzymy a *optrA*, jehož produktem je ABC transporter [47]. Avšak použití genů rezistence pro

rozlišení humánních a zvířecích druhů má svoje limity – geny rezistence se mohou v populaci rychle šířit horizontálním přenosem nebo spolu s transpozicií elementy a jejich přenos úzce souvisí se selekčním tlakem v prostředí. Navíc izoláty enterokoků humánního původu mohou vykazovat značné rozdíly v citlivosti k antibiotikům i v rámci jednoho druhu a jednoho prostředí. Proto použití antibiotických genů jako markerů má pravděpodobně jen omezené uplatnění.

ZÁVĚR

Příspěvek shrnuje testované a publikované molekulární markery, které byly nebo mohou být použity pro druhové rozlišení enterokoků, což by mělo pomoci při charakterizaci jejich původu v koupacích vodách. Většina studií se zabývá vždy jedním vhodným genem, ale to může být při analýze přírodních navíc znečištěných vzorků nedostačující. Pro spolehlivé zařazení enterokoků do druhů by bylo tedy lepší použít kombinaci několika genů včetně jednoho rodově specifického obsahujícího část 16S rRNA. Naser navrhl použít kombinaci genů *rpoA*, *pheS* a *atpA* a 16S rDNA pro typizaci enterokoků. Svoje výsledky však ověřoval na čistých kulturách. Bylo by tedy zajímavé přenést tyto poznatky do praxe a ověřit je i na přírodních vzorcích koupacích vod. Kromě toho by z uvedeného výčtu mohl být pro typizaci použit ještě některý z genů navržených Zeiglerem a kolektivem jako např. gen *recN* případně *glyA* nebo *thdF*. Pro tyto geny by ale bylo nutné udělat ještě podrobnější *in silico* sekvenční analýzy. Zdá se, že kromě kódujících oblastí, jsou zajímavé i intergenové oblasti, jako např. oblasti mezi geny pro tRNA. Jejich výhodou je možnost použití universálních primerů v konzervovaných oblastech i možnost srovnání s jinými rody, u nichž byl již tento přístup použit.

Výčet zde prezentovaných kandidátů není zdaleka úplný a v literatuře existuje ještě řada dalších možných genových oblastí, které by bylo možné použít jako např. další geny kódující proteiny primárního metabolismu, nebo naopak repetitivní nic-nekodující sekvence. Některé nebyly uvedeny z praktického důvodu, neboť se nehodily pro jednoznačné odlišení původu znečištění nebo k nim není v současné době dostatek dat (nebylo na ně odkázáno ve více studiích). Je zde však velký potenciál dalších možných kandidátů.

Poděkování

Tento příspěvek vznikl v rámci projektu TA ČR TJ04000132 Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách.

Literatura

- [1] ŠVEC, P. and FRANZ, C.M.A.P. Part III: The family Enterococcaceae. In: *HOLZAPFEL, W.H. and WOOD, B.J.B. (eds.). Lactic acid bacteria. Wiley Blackwell, 2014, p. 171–211.*
- [2] ŠVEC, P. et al. Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspera*. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, Vol. 92, No. 5, p. 951–957.
- [3] SIGNORETTO, C. et al. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, Vol. 71, No. 5, p. 2756–2761. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2756-2761.2005.
- [4] ŠVEC, P. et al. *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, 62, Pt 7, p. 1499–1505. DOI: 10.1099/ijs.0.033357-0.
- [5] OTT, E.M. et al. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, Vol. 91, No. 1, p. 54–66. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01334.x.
- [6] SIGNORETTO, C. et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, Vol. 70, No. 11, p. 6892–6896. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6892-6896.2004.
- [7] BYAPPANAHALLI, M. and FUJIOKA, R. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Sci. Technol.*, 2004, Vol. 50, No. 1, p. 27–32. ISSN 0273-1223.

- [8] WHITEHEAD, M. and GODFREE, V. Imperial Cancer Research Fund and the Lancet. *Lancet*, 1997, 350, 9091, p. 1627. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)64042-1.
- [9] GODFREE, A.F. et al. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83, S1, p. 110–119. DOI: 10.1046/j.1365-2672.83.s1.12.x.
- [10] MULLER, T. et al. Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, Vol. 91, No. 2, p. 268–278. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x.
- [11] ZEIGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53, Pt 6, p. 1893–1900. DOI: 10.1099/ijs.0.02713-0.
- [12] FRANK, K.L. et al. AhrC and Eep are biofilm infection-associated virulence factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, 2013, Vol. 81, No. 5, p. 1696–1708. DOI: 10.1128/IAI.01210-12.
- [13] OZAWA, Y. et al. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.*, 1997, Vol. 179, No. 23, p. 7468–7475. DOI: 10.1128/jb.179.23.7468-7475.1997.
- [14] RICE, L.M. et al. Design of a single-tube, endpoint, linear-after-the-exponential-PCR assay for 17 pathogens associated with sepsis. *J. Appl. Microbiol.*, 2013, Vol. 114, No. 2, p. 457–469. DOI: 10.1111/jam.12061.
- [15] KIM, S.Y. et al. Simultaneous Identification of 13 Foodborne Pathogens by Using Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism Coupled with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Its Application in Foods. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2016, 13, 10, p. 566–574. DOI: 10.1089/fpd.2016.2143.
- [16] GLAZUNOVA, O.O. et al. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60, Pt 9, p. 2140–2148. DOI: 10.1099/ijs.0.018176-0.
- [17] DEASY, B.M. et al. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, 23, 4, p. 510–522. DOI: 10.1016/S0723-2020(00)80025-9.
- [18] BERNHARD, A.E. and FIELD, K.G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 4, p. 1587–1594. DOI: 10.1128/aem.66.4.1587-1594.2000.
- [19] LAYTON, A. et al. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 6, p. 4214–4224. DOI: 10.1128/AEM.01036-05.
- [20] FIKSDAL, L. et al. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49, 1, p. 148–150. DOI: 10.1128/AEM.49.1.148-150.1985.
- [21] KREADER, C.A. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 4, p. 1171–1179. DOI: 10.1128/AEM.61.4.1171-1179.1995.
- [22] DICK, L.K. et al. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 6, p. 3184–3191. DOI: 10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005.
- [23] DEVRIESE, L.A. et al. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, Vol. 92, No. 5, p. 821–827. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01586.x.
- [24] TSIODRAS, S. et al. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 3991–3993. DOI: 10.1128/JCM.38.11.3991-3993.2000.
- [25] FACKLAM, R.R. and COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, Vol. 27, No. 4, p. 731–734. DOI: 10.1128/JCM.27.4.731-734.1989.
- [26] TYRRELL, G.J. et al. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, Vol. 35, No. 5, p. 1054–1060. DOI: 10.1128/JCM.35.5.1054-1060.1997.
- [27] BAELE, M. et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 4201–4207. DOI: 10.1128/JCM.38.11.4201-4207.2000.
- [28] MCCLELLAND, M. et al. Length polymorphisms in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, Vol. 30, No. 6, p. 1499–1504. DOI: 10.1128/JCM.30.6.1499-1504.1992.
- [29] EHRENSTEIN, B. et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, Vol. 34, No. 10, p. 2414–2420. DOI: 10.1128/JCM.34.10.2414-2420.1996.
- [30] VANECHOUTTE, M. et al. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, 48, Pt 1, p. 127–139. DOI: 10.1099/00207713-48-1-127.
- [31] MAES, N. et al. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, Vol. 35, No. 10, p. 2477–2481. DOI: 10.1128/JCM.35.10.2477-2481.1997.
- [32] WELSH, J. and MCCLELLAND, M. PCR-amplified length polymorphisms in tRNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. *Mol. Microbiol.*, 1992, Vol. 6, No. 12, p. 1673–1680. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00892.x.
- [33] NASER, S.M. et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151, Pt 7, p. 2141–2150. DOI: 10.1099/mic.0.027840-0.

- [34] KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, No. 11, p. 3497–3503. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3497-3503.1999.
- [35] DUTKA-MALEN, S. et al. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, Vol. 33, No. 1, p. 24–27. DOI: 10.1128/JCM.33.1.24-27.1995.
- [36] HARWOOD, V.J. et al. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, Vol. 38, No. 6, p. 476–482. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01518.x.
- [37] JACKSON, C.R. et al. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, Vol. 42, No. 8, p. 3558–3565. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004.
- [38] LAYTON, B.A. et al. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, Vol. 109, No. 2, p. 539–547. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x.
- [39] NASER, S. et al. Phylogeny and identification of Enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, Vol. 43, No. 5, p. 2224–2230. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2224-2230.2005.
- [40] GOH, S.H. et al. Identification of Enterococcus species and phenotypically similar Lactococcus and Vagococcus species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 3953–3959. DOI: 10.1128/JCM.38.11.3953-3959.2000.
- [41] SCOTT, T.M. et al. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, Vol. 39, No. 1, p. 283–287.
- [42] LAYTON, B.A. et al. Distribution and diversity of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in animal hosts and the Pacific coast environment. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, Vol. 106, No. 5, p. 1521–1531. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04113.x.
- [43] WHITMAN, R.L. et al. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, Vol. 41, No. 17, p. 6090–6095. DOI: 10.1021/es070817t.
- [44] GOLINSKA, E. et al. Virulence factors of Enterococcus strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 19, No. 23, p. 3562–3572. DOI: 10.3748/wjg.v19.i23.3562.
- [45] EVERS, S. et al. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene*, 1994, Vol. 140, No. 1, p. 97–102. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90737-4.
- [46] NAVARRO, F. and COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1994, Vol. 38, No. 8, p. 1788–1793. DOI: 10.1128/aac.38.8.1788.
- [47] SADOWY, E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid*, 2018, 99, p. 89–98. DOI: 10.1016/j.plasmid.2018.09.011.

Autoři

RNDr. Šárka Bobková, Ph.D.

✉ sarka.bobkova@szu.cz

ORCID: 0000-0003-3552-2530

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

✉ dana.baudisova@szu.cz

ORCID: 0000-0003-3993-6845

Státní zdravotní ústav

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.12.005

SEARCH FOR SUITABLE MOLECULAR MARKERS FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF ENTEROCOCCI

BOBKOVA, S.; BAUDISOVA, D.

National Institute of Public Health

Keywords: *Enterococcus* – faecal contamination – molecular markers – microbial source tracking (MST)

Enterococci, together with representatives of the species *Escherichia coli*, belong to the so-called indicators of faecal pollution, which are used in the evaluation of the microbiological quality of bathing waters. Their determination is governed by the Decree of the Ministry of Health No. 238/2011 Coll. and performed by culture on selective agar media. It is known that not all types of enterococci are of fecal origin and are therefore directly related to fecal water pollution. To properly assess the quality of bathing water, it would be useful to know the origin of these bacteria. For tracing the origin of these microorganisms (so-called microbial source tracking) the molecular biology methods can be used. Using PCR method, different types of enterococci can be distinguished by amplification of molecular markers (ie specific parts of DNA). There are many publications dealing with this topic, however, in most studies, only one marker is analyzed for species differentiation, and this may not always be sufficient when working with natural samples. For reliable species identification in natural samples, it would be more advantageous to use a combination of several markers. At the same time, it would be appropriate to apply the knowledge gained from experiments with pure cultures to natural samples of bathing water, both pure and faecally polluted. For practice, it would be also important to use procedures enabling PCR from a mixed natural sample, without the need for pre-cultivation on selective media, in order to minimize the time for which the result is known.

The aim of this paper is to summarize the published molecular markers for the identification of both enterococci and related microorganisms, and to evaluate their possible use in water microbiology for the rapid classification of *Enterococcus* species into species during the analysis of natural samples.