

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta

**M U N I**  
**S C I**

# Systematika rodu *Enterococcus*

Habilitační práce

## **Poděkování**

Mé poděkování patří všem současným i minulým kolegyním a kolegům, se kterými jsem měl tu čest spolupracovat na poli oboru taxonomie bakterií. Z těch všech bych rád poděkoval především doc. RNDr. Ivo Sedláčkovi, CSc. za to, že mi jako přednášející předmětu Taxonomie bakterií, jako vedoucí mé diplomové práce i v následujících letech jako kolega na pracovišti České sbírky mikroorganismů ukázal krásu oboru taxonomie bakterií. Dále Dr. Luc Devriesemu, jednomu z nestorů taxonomie grampozitivních koků za to, že mi v roce 2001 umožnil strávit tři měsíce na jeho pracovišti, kde jsem popsal své první dva nové druhy enterokoků a načerpal řadu zkušeností a inspiraci pro další roky práce. A jako třetímu Dr. Marc Vancanneytovi, který byl v roce 2004 mým superviseorem v průběhu mého téměř ročního post-doc pobytu na pracovištích Oddělení mikrobiologie a BCCM/LMG sbírky mikroorganismů univerzity v Gentu, kde jsem měl možnost naučit se nové taxonomické techniky, popsat další řadu nových druhů a navázat mezi našimi pracovišti přátelskou spoluprací, která přetrvává až do dnešní doby.

Mé poděkování patří mým rodičům, manželce a dětem, kteří mě s pochopením vždy podporovali v mém zájmu o ta "neviditelná zvířátka", a kteří mě každý den ukazují, že nejen ten bakteriální svět je pestrý, krásný a plný nečekaných překvapení.

## Obsah

1. Předmluva.....	1
2. Úvod.....	2
3. Vývoj klasifikace a nomenklatury rodu <i>Enterococcus</i> .....	3
4. Fylogenetická pozice a struktura rodu <i>Enterococcus</i> .....	6
5. Identifikace zástupců rodu <i>Enterococcus</i> pomocí fenotypových metod.....	9
6. Identifikace zástupců rodu <i>Enterococcus</i> pomocí genotypových metod .....	11
6.1. Charakteristika genomu zástupců rodu <i>Enterococcus</i> .....	13
7. Ekologie rodu <i>Enterococcus</i> .....	14
7.1. Voda.....	14
7.2. Rostliny.....	15
7.3. Půda.....	16
7.4. Živočichové a člověk .....	16
7.5. Potraviny .....	19
8. Klinický význam rodu <i>Enterococcus</i> .....	20
9. Praktický význam rodu <i>Enterococcus</i> .....	22
10. Závěr .....	23
11. Komentované publikace autora.....	24
11.1. Švec, P., Sedláček, I. (1999). Occurrence of <i>Enterococcus</i> spp. in waters. <i>Folia Microbiol</i> 44, 3-10. ....	26
11.2. Švec, P., Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2001). <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> sp. nov. and <i>Enterococcus moraviensis</i> sp. nov., new species isolated from water. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 51, 1567-1574. ....	27
11.3. Švec, P., Sedláček, I., Pantůček, R., Devriese, L., Doškař, J. (2001). Evaluation of ribotyping for characterization and identification of <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> and <i>Enterococcus moraviensis</i> strains. <i>FEMS Microbiol Lett</i> 203, 23-27.....	28
11.4. Švec, P., Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2002). Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail <i>Helix aspersa</i> . <i>J Appl Microbiol</i> 92, 951-957. ....	29
11.5. Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG) <sub>5</sub> -PCR for identification of <i>Enterococcus</i> spp. <i>FEMS Microbiol Lett</i> 247, 59-63. ....	30
11.6. Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Švec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., Swings, J. (2005). <i>Enterococcus canintestini</i> sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 55, 2177-2182.....	31

11.7. Švec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2005). <i>Enterococcus aquimarinus</i> sp. nov., isolated from sea water. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 55, 2183-2187.....	32
11.8. Švec, P., Vancanneyt, M., Koort, J., Naser, S., Hoste, B., Vihavainen, E., Vandamme, P., Swings, J., Björkroth, J. (2005). <i>Enterococcus devriesei</i> sp. nov., associated with animal sources. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 55, 2479-2484.....	33
11.9. Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2006). <i>Enterococcus silesiacus</i> sp. nov. and <i>Enterococcus termitis</i> sp. nov. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 56, 577-581.....	34
11.10. Lauková, A., Švec, P., Stropfová, V., Štětina, V., Sedláček, I. (2007). Properties of the strains <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> and <i>E. moraviensis</i> , new species among enterococci. <i>Folia Microbiol</i> 52, 273-279.....	35
11.11. Švec, P., Vandamme, P., Bryndová, H., Holochová, P., Kosina, M., Mašlaňová, I., Sedláček, I. (2012). <i>Enterococcus plantarum</i> sp. nov., isolated from plants. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 62, 1499-1505.....	36
11.12. Frolková, P., Ghosh, A., Švec, P., Zurek, L., Literák, I. (2012). Use of the manganese-dependent superoxide dismutase gene <i>sodA</i> for rapid identification of recently described enterococcal species. <i>Folia Microbiol</i> 57, 439-442.....	37
11.13. Niemi, R.M., Ollinkangas, T., Paulin, L., Švec, P., Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M., Lindström, K. (2012). <i>Enterococcus rivorum</i> sp. nov., from water of pristine brooks. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 62, 2169-2173.....	38
11.14. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlaňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., Švec P. (2013). <i>Enterococcus ureilyticus</i> sp. nov. and <i>Enterococcus rotai</i> sp. nov., two novel urease-producing enterococci from the environment. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 63, 502-510.....	39
11.15. Frolková, P., Švec, P., Sedláček, I., Mašlaňová, I., Černošlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměšský, T., Literák, I. (2013). <i>Enterococcus alcedinis</i> sp. nov., isolated from common kingfisher ( <i>Alcedo atthis</i> ). <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> 63, 3069-3074.....	40
11.16. Beneš J., Džupová, O., Šetina, M., Feuereisl, R., Švec, P., Pantůček, R. (2013). Relapsing endocarditis caused by <i>Enterococcus faecalis</i> forming small colony variants. <i>Scand J Inf Dis</i> 45, 800-803.....	41
11.17. Šplíchalová, P., Švec, P., Ghosh, A., Zurek, L., Oravcová, V., Radiměšský, T., Bohuš, M., Literák, I. (2015). Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. <i>Anton Leeuw Int J G</i> 107, 1281-1289.....	42
11.18. Oravcová, V., Švec, P., Literák, I. (2017). Vancomycin-resistant enterococci with <i>vanA</i> and <i>vanB</i> genes in Australian gulls. <i>Environ Microbiol Rep</i> 9, 316-318.....	43
12. Literatura .....	44

## 1. Předmluva

"Co ještě chcete zkoumat na taxonomii enterokoků, pane kolego?"

"To je přece už dávno uzavřená kapitola ..."

Tuto nepříliš povzbudivou větu jsem jako student magisterského studia oboru Obecné biologie se zaměřením na mikrobiologii vyslechl od jednoho váženého profesora Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v roce 1995, když jsme byli v průběhu kolokvia dotazováni na témata našich diplomových prací. V rámci své práce jsem se totiž věnoval taxonomickému studiu enterokoků izolovaných z humánního klinického materiálu. Jak ukáže tato habilitační práce, pan profesor se mýlil. Je ale nutno dodat, že jeho odborným zaměřením nebyla taxonomie bakterií, a že měl i podle současných taxonomických znalostí z lékařského profesního pohledu svým způsobem tak trochu svou pravdu. I dnes, stejně jako v roce 1995, dominují v klinických laboratořích pouze dva druhy enterokoků, jmenovitě *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, které byly popsány již v roce 1984, takže většiny kmenů enterokoků relevantních pro rutinní lékařskou mikrobiologii se novější taxonomický výzkum přímo příliš nedotýká. Pravdou však je, že *E. faecalis* a *E. faecium* nejsou jediné dva druhy, které je možno z humánního klinického materiálu izolovat, a již zde bylo zachyceno také šest novějších druhů popsaných až v letech 2002 až 2008.

Touto vzpomínkou nechci ani v nejmenším znevažovat vědomosti dotyčného pana profesora. Neodolal jsem však pokušení ji zde vzpomenout, protože tato věta z roku 1995 je v kontrastu tehdejších a dnešních znalostí, byť jen o tomto jediném bakteriálním rodu, krásnou ukázkou toho, jakým rozvojem v posledních 20 letech obor Taxonomie bakterií prošel. V uvedeném roce 1995 bylo známo 19 druhů rodu *Enterococcus*, zatímco k dnešnímu datu je validně popsáno již 59 druhů. A nepochybně to není konečný počet. Díky masivnímu nástupu molekulárně-biologických technik do oblasti identifikace a typizace mikroorganismů, a v dnešní době především díky zavádění rychlejších a dostupnějších metod celogenomového sekvenování, lze v taxonomii bakterií očekávat v blízké budoucnosti řadu změn a nových poznatků.

Mýlit se je lidské a já jsem rád, že se tehdy pan profesor mýlil. Bez toho by totiž tato habilitační práce nemohla vzniknout. A nejen to. Je to také laskavá připomínka skutečnosti, jak málo stále víme o bakteriální diverzitě na naší planetě. To je však i příslib, že nás v oblasti studia systematiky mikroorganismů ještě čeká mnoho práce i řada nových objevů a překvapení.

Pavel Švec

Brno, srpen 2019

## 2. Úvod

Bakterie, přesněji řečeno prokaryotické organismy domén *Bacteria* a *Archaea*, představují nejpočetnější buněčné organismy na této planetě. Tyto organismy osídlují prakticky všechny známé ekosystémy a díky své zásadní roli pro koloběh látek v přírodě jsou nepostradatelné pro udržení stability celého ekosystému naší planety Země, a tím jsou nezbytným předpokladem pro existenci všech vyšších forem života (Robbins a kol., 2016, Whitman a kol., 1998). Zcela přirozeně jsme zcela zásadně ovlivňováni bakteriemi také my, lidé, a to jak bakteriemi přítomnými v prostředí či v potravinách, tak bakteriemi osídlujícími lidské tělo, které je kolonizováno přibližně stejným množstvím bakterií ( $3,8 \times 10^{13}$ ) jako je počet buněk našeho těla ( $3,0 \times 10^{13}$ ) (Sender a kol., 2016). Jedním z bakteriálních rodů, se kterým se člověk běžně setkává v prostředí, ve fermentovaných potravinách, a který je běžnou součástí mikroflóry našeho těla, je i bakteriální rod *Enterococcus*, kterému je věnována tato habilitační práce.

Enterokoky nalézáme ve slaných i sladkých vodách, na vodních i suchozemských rostlinách, v menší míře v půdách, a jsou také běžnou součástí mikroflóry nejrůznějších bezobratlých živočichů i obratlovců (Švec a Franz, 2014a). Pro člověka jsou zástupci tohoto rodu prospěšní díky své využitelnosti v potravinářském průmyslu, kde je nalézáme jako součást bakteriálních společenstev při fermentaci mléčných, rostlinných i masných výrobků, avšak jsou také izolováni jako původci kažení potravin (Franz a kol., 2003). Díky svému oportunně patogennímu potenciálu a časté multirezistenci k antimikrobiálním látkám jsou enterokoky původci pestré škály endogenních i exogenních infekcí a jsou předními původci infekcí nozokomiálních (Teixeira a kol., 2015). Enterokoky jsou také zajímavé z pohledu výzkumu horizontálního přenosu genů, protože disponují řadou plazmidů a transpozonů, které jsou specifickými mechanismy přenášeny mezi různými kmeny v rámci svého rodu i mezi enterokoky a jinými bakteriálními skupinami (Biavasco a kol., 1996, Noble a kol., 1992, Weaver, 2006). Jsou to také mikroorganismy produkující řadu extrabuněčných produktů, které se jako virulentní faktory uplatňují v průběhu patogeneze infekcí nebo mohou být využity v potravinářství díky svému inhibičnímu účinku na jiné bakterie, jako je tomu v případě kmenů produkujících bakteriociny. Vybrané kmeny enterokoků jsou také díky svému pozitivnímu vlivu na zdraví hospodářských zvířat a člověka využívány v několika komerčních probiotických preparátech (Hanchi a kol., 2018).

Díky svému téměř ubikvitnímu rozšíření a všem výše uvedeným pozitivním i negativním vlastnostem se s enterokoky setkává řada vědeckých oblastí a tyto organismy jsou předmětem systematického výzkumu odborníků mikrobiologických, epidemiologických, klinických, hygienických, molekulárně-genetických, potravinářských či biochemických oborů. Setrvalý zájem o tento již 35 let známý bakteriální rod dokladuje také nemalý počet vědeckých publikací uveřejněných každoročně v odborných časopisech. Vyhledávání hesla "enterococc\*" (pozn. pro "enterococcus", "enterococci", "enterococcal") v odborné databázi Web of Science ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)) nabídne přes 34 000 citací, z nichž 2 300 bylo publikováno v minulém roce 2018. Přestože se tyto práce z velké části týkají především

výzkumu enterokoků s ohledem na jejich význam v humánní klinické mikrobiologii a v potravinářství, je zde možno nalézt dlouhou řadu studií ze všech dalších výše uvedených vědeckých oborů. Toto velké množství informací pokrývající nejrůznější aspekty biologie enterokoků má však jedno společné - a tím je taxonomie. Je to taxonomie, která je základem pro komunikaci mezi biology, protože pojmenovává a specifikuje předmět jejich výzkumu a vytváří tak referenční systém pro všechny získané znalosti. Výsledky taxonomických studií, které jednotlivé druhy rodu *Enterococcus* definují, charakterizují, pojmenovávají a poskytují tak možnost jejich identifikace, jsou proto prvním krokem k jejich dalšímu poznání a jsou základem pro sdílení těchto poznatků vědeckou komunitou.

Tato habilitační práce je koncipovaná jako soubor 18 komentovaných publikací, které dokumentují výsledky výzkumné činnosti a přínos autora na poli systematiky bakteriálního rodu *Enterococcus*, která zahrnuje jak taxonomii tak ekologii a význam tohoto rodu v oblastech klinické mikrobiologie a v potravinářství. V úvodních kapitolách je popsán současný stav taxonomie rodu *Enterococcus* a s ohledem na aktuálně popsané druhy jsou zde zpracovány kapitoly týkající se ekologie a významu rodu *Enterococcus* pro člověka. Ve druhé části práce jsou komentovány vybrané publikace autora. Jednotlivé odborné články byly publikovány v letech 1999 až 2017 a u poloviny z nich je autor této habilitační práce prvním autorem. Z vybraného souboru komentovaných publikací představuje polovina prací popisy 12 nových druhů rodu *Enterococcus* izolovaných z vod, živočichů a rostlin. Druhou polovinou publikací jsou práce zabývající se využitím molekulárně-biologických technik pro typizaci a identifikaci enterokoků a jejich aplikaci pro charakterizaci kmenů z environmentálních i klinických zdrojů. Výsledky získané v těchto 18 vybraných publikacích jsou však také zasazeny v kontextu ostatních kapitol práce, kde jsou tyto citace pro přehlednost zvýrazněny tučně.

### **3. Vývoj klasifikace a nomenklatury rodu *Enterococcus***

Bakteriální rod *Enterococcus* byl validně popsán Schleiferem a Kilpper-Bälzovou v roce 1984, kdy byly na základě DNA-DNA a DNA-RNA hybridizace z rodu *Streptococcus* vyčleněny druhy *Streptococcus faecalis* a *Streptococcus faecium*, které byly reklasifikovány do rodu *Enterococcus* (Schleifer a Kilpper-Bälz, 1984). Odlišnost enterokoků od zbývajících streptokoků však byla v literatuře popsána již mnohem dříve. Pro pojmenování grampozitivních intestinálních koků uspořádaných ve dvojicích nebo v krátkých řetězcích použil termín "entérocoque" poprvé Thiercelin (1899) a rodové jméno *Enterococcus* bylo poté použito Thiercelinem a Jouhaudem (1903), ale toto pojmenování nebylo vědeckou komunitou akceptováno. Tyto humánní intestinální koky byly o tři roky později pojmenovány jako *S. faecalis* (Andrewes a Horder, 1906), což tuto skupinu bakterií definovalo jako součást rodu *Streptococcus*. Druhé druhové jméno, *S. faecium*, bylo poprvé použito pro pojmenování bakterií fekálního původu, které vykazovaly specifické výsledky testů fermentace arabinózy, xylózy, mannitolu a sacharózy (Orla-Jensen, 1919). Mimo tyto dva druhy byla v rámci raných taxonomických studií grampozitivních fekálních streptokoků popsána také řada dalších

druhů, jako například *Streptococcus glycerinaceus*, *Streptococcus liquefaciens* či *Streptococcus zymogenes* (Deibel, 1964, Orla-Jensen, 1919), ale tato druhová jména nebyla akceptována a nepromítla se do současné taxonomie. Ani samotný termín "enterokoky" nebyl jasně definován a byl různými autory používán nejednotně (Graham a Bartley, 1939). Také z tohoto důvodu jsou tyto prvotní práce nejednoznačné a jejich výsledky jsou z taxonomického pohledu obtížně uchopitelné a přenositelné na aktuálně známé taxony.

Významným mezníkem v taxonomii streptokoků, a tím také enterokoků, byla práce publikovaná Shermanem (1937), který rozdělil streptokoky s využitím serotypizace popsané Lancefieldovou (1933) a dále pomocí testů pro hemolýzu, redukci lakmusového mléka, produkci amoniaku z peptonů, růsty v 10°C a 45°C, v médiu s 6,5% NaCl, při pH 9,6 a v přítomnosti 0,1% methylenové modři a schopnosti přežít 60°C po dobu 30 minut. Definoval tak čtyři skupiny streptokoků, a to pyogenní, viridující, mléčné a enterokoky. K této práci je nutno dodat, že navržené členění se promítá i do současné taxonomie streptokoků, a že řada testů, které Sherman ve své práci využil, je v taxonomii enterokoků využívána až do dnešní doby. V rámci skupiny enterokoků Sherman rozlišil druhy *S. faecalis*, *S. liquefaciens*, *S. zymogenes* a *Streptococcus durans*. Druh *S. faecium* považoval za synonymní se *S. faecalis*. Další významnou prací byla pro taxonomii enterokoků studie Deibela a kol. (1963), kteří popsali *S. liquefaciens* a *S. zymogenes* jako variety *S. faecalis* a *S. durans* jako varietu *S. faecium*. Na rozdíl od Shermana tedy zařadili mezi enterokoky pouze dva druhy, a to *S. faecalis* a *S. faecium*. Další návrh na vyčlenění skupiny enterokoků z rodu *Streptococcus* a validaci rodového jména *Enterococcus* publikoval Kalina (1970), který pro tento rod navrhl typový druh *E. faecalis*, se dvěma varietami *E. faecalis* var. *liquefaciens* a *E. faecalis* var. *zymogenes* a druhým druhem *E. faecium* s poddruhem *E. faecium* subsp. *durans*. Ani tento návrh však nebyl taxonomickou komisí akceptován a tyto taxony nebyly zařazeny do Approved Lists of Bacterial Names (Skerman a kol., 1980), kde byla zásadním způsobem revidována a validována veškerá dosavadní taxonomická klasifikace a nomenklatura a byla zavedena pravidla pro popis dalších bakteriálních taxonů. Ze skupiny enterokoků tak byly v tomto seznamu stále ještě v rámci rodu *Streptococcus* validovány druhy *S. faecalis* a *S. faecium*. Jak je již zmíněno v úvodu této kapitoly, validně byly druhy *S. faecalis* a *S. faecium* vyčleněny do nového rodu *Enterococcus* až Schleiferem a Kilpper-Bälzovou v roce 1984. Na základě údajů dostupných z literatury i svých vlastních experimentů ukázali autoři této práce jasnou fenotypovou i genotypovou odlišnost obou uvedených druhů od zbývajících zástupců rodu *Streptococcus* a navrhli jejich vyčlenění do nového rodu *Enterococcus*. Ačkoliv byl tento návrh validován, nebyl rod *Enterococcus* ještě začleněn do následujícího vydání Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Mundt, 1986), protože kapitola věnovaná enterokokům byla v době vydání návrhu popisu rodu *Enterococcus* již dokončena. Popisy dalších nově objevených druhů i reklasifikace dalších zástupců z rodu *Streptococcus* pak pokračovaly od roku 1984 až do dnešní doby. Zatím poslední publikace s nově navrženými druhy *Enterococcus dongliensis*, *Enterococcus hulanensis*, *Enterococcus nangangensis*, *Enterococcus pingfangensis* a *Enterococcus songbeiensis* (Li a Gu, v tisku) je v době psaní této kapitoly v tisku v International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.



V době vzniku této práce obsahuje rod *Enterococcus* celkem 59 validně popsanych druhů. Z toho jeden druh, *Enterococcus saccharolyticus*, zahrnuje 2 poddruhy. Jednotlivé druhy s citací efektivní publikace jsou v abecedním pořadí uvedeny v následující Tabulce 1. V tomto přehledu je již zahrnuto i pět druhů, jejichž popisy jsou aktuálně v tisku v International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Naopak zde není uveden v letošním roce navržený druh *Enterococcus timonensis* popsáný na základě charakteristiky jednoho kmene izolovaného ze sputa zdravého muže (Mbogning Fonkou a kol., 2019), protože v době přípravy této práce nebylo druhové jméno *E. timonensis* validováno.

**Tabulka 1.** Seznam validně popsanych druhů rodu *Enterococcus* (k datu 10. září 2019)

<i>E. alcedinis</i> (Frolková a kol., 2013)*	<i>E. malodoratus</i> (Collins a kol., 1984)
<i>E. aquimarinus</i> (Švec a kol., 2005a)	<i>E. moraviensis</i> (Švec a kol., 2001a)
<i>E. asini</i> (de Vaux a kol., 1998)	<i>E. mundtii</i> (Collins a kol., 1986)
<i>E. avium</i> (Collins a kol., 1984)	<i>E. nangangensis</i> (Li a Gu, v tisku)
<i>E. bulliens</i> (Kadri a kol., 2015)	<i>E. olivae</i> (Lucena-Adrós a kol., 2014)
<i>E. caccae</i> (Carvalho a kol., 2006)	<i>E. pallens</i> (Tyrrell a kol., 2002)
<i>E. camelliae</i> (Sukontasing a kol., 2007)	<i>E. phoeniculicola</i> (Law-Brown a Meyers, 2003)
<i>E. canintestini</i> (Naser a kol., 2005c)	<i>E. pingfangensis</i> (Li a Gu, v tisku)
<i>E. canis</i> (De Graef a kol., 2003)	<i>E. plantarum</i> (Švec a kol., 2012)
<i>E. casseliflavus</i> (Collins a kol., 1984)	<i>E. pseudoavium</i> (Collins a kol., 1989)
<i>E. cecorum</i> (Williams a kol., 1989)	<i>E. quebecensis</i> (Sistek a kol., 2012)
<i>E. columbae</i> (Devriese a kol., 1990)	<i>E. raffinosus</i> (Collins a kol., 1989)
<i>E. crotali</i> (McLaughlin a kol., 2017)	<i>E. ratti</i> (Teixeira a kol., 2001)
<i>E. devriesei</i> (Švec a kol., 2005b)	<i>E. rivorum</i> (Niemi a kol., 2012)
<i>E. diestrammenae</i> (Kim a kol., 2013)	<i>E. rotai</i> (Sedláček a kol., 2013)
<i>E. dispar</i> (Collins a kol., 1991)	<i>E. saccharolyticus</i> (Rodrigues a Collins, 1990)
<i>E. dongliensis</i> (Li a Gu, v tisku)	<i>E. s. subsp. saccharolyticus</i> (Chen a kol., 2013a)
<i>E. durans</i> (Collins a kol., 1984)	<i>E. s. subsp. taiwanensis</i> (Chen a kol., 2013a)
<i>E. eurekensis</i> (Cotta a kol., 2013)	<i>E. saigonensis</i> (Harada a kol., 2016)
<i>E. faecalis</i> (Schleifer a Kilpper-Bälz, 1984)	<i>E. silesiacus</i> (Švec a kol., 2006)
<i>E. faecium</i> (Schleifer a Kilpper-Bälz, 1984)	<i>E. songbeiensis</i> (Li a Gu, v tisku)
<i>E. florum</i> (Techo a kol., 2019)	<i>E. sulfureus</i> (Martinez-Murcia a Collins, 1991)
<i>E. gallinarum</i> (Collins a kol., 1984)	<i>E. termitis</i> (Švec a kol., 2006)
<i>E. gilvus</i> (Tyrrell a kol., 2002)	<i>E. thailandicus</i> (Tanasupawat a kol., 2008)
<i>E. haemoperoxidus</i> (Švec a kol., 2001a)	<i>E. ureasiticus</i> (Sistek a kol., 2012)
<i>E. hermanniensis</i> (Koort a kol., 2004)	<i>E. ureilyticus</i> (Sedláček a kol., 2013)
<i>E. hirae</i> (Farrow a Collins, 1985)	<i>E. viikkiensis</i> (Rahkila a kol., 2011)
<i>E. hulanensis</i> (Li a Gu, v tisku)	<i>E. villorum</i> (Vancanneyt a kol., 2001)
<i>E. italicus</i> (Fortina a kol., 2004)	<i>E. wangshanyuanii</i> (Jin a kol., 2017)
<i>E. lactis</i> (Morandi a kol., 2012)	<i>E. xiangfangensis</i> (Li a kol., 2014)
<i>E. lemanii</i> (Cotta a kol., 2013)	

\*V závorkách jsou uvedeny citace efektivní publikace; citace publikací uvedených v souboru komentovaných publikací v rámci této práce jsou zvýrazněny tučně.

V průběhu historického vývoje taxonomie rodu *Enterococcus* však nebyly nové druhy pouze popisovány, ale několik jich také již bylo z rodu *Enterococcus* reklasifikováno do jiných rodů nebo popsáno jako druhy synonymní. Druh *Enterococcus seriolicida* (Kusuda a kol., 1991) představoval mladší synonymum druhu *Lactococcus garvieae* (Eldar a kol., 1996) a *Enterococcus solitarius* (Collins a kol., 1989) byl reklasifikován do rodu *Tetragenococcus*, jako druh *Tetragenococcus solitarius* (Ennahar a Cai, 2005). Synonymně popsány druhy byly *Enterococcus porcinus* (Teixeira a kol., 2001), který byl mladším synonymem druhu *Enterococcus villorum* (De Graef a kol., 2003). *Enterococcus flavescens* (Pompei a kol., 1992) byl mladším synonymem druhu *E. casseliflavus* (Naser a kol., 2006) a druhové jméno *Enterococcus saccharominimus* (Vancanneyt a kol., 2004) bylo mladším synonymem druhu *Enterococcus italicus* (Naser a kol., 2006). Tato mladší synonymní druhová jména by tedy již nadále neměla být používána.

V odborné literatuře i v internetových databázích DNA sekvencí se bohužel můžeme setkat i s druhovými jmény, která nebyla popsána validně. Jedná se například o jména *Enterococcus sanguinicola* (Ben Belgacem a kol., 2009, Carvalho a kol., 2008, Shewmaker a kol., 2011), *Enterococcus hawaiiensis* (Ben Belgacem a kol., 2009, Teixeira a kol., 2015, Zhang a kol., 2011), *Enterococcus pernyi* (Sun a kol., 2016, Wang a kol., 2010), *Enterococcus azikeevi* (Fei a kol., 2006), *Enterococcus horridus* (Lauer a kol., 2016) či *Enterococcus inusitatus* (Jung a Regan, 2007). Tato druhová jména jsou však z taxonomického pohledu neplatná a neměla by být používána, protože nebyla publikována ani validována v *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, což je aktuálně jedním ze základních pravidel pro popis a návrh jmen nových bakteriálních taxonů.

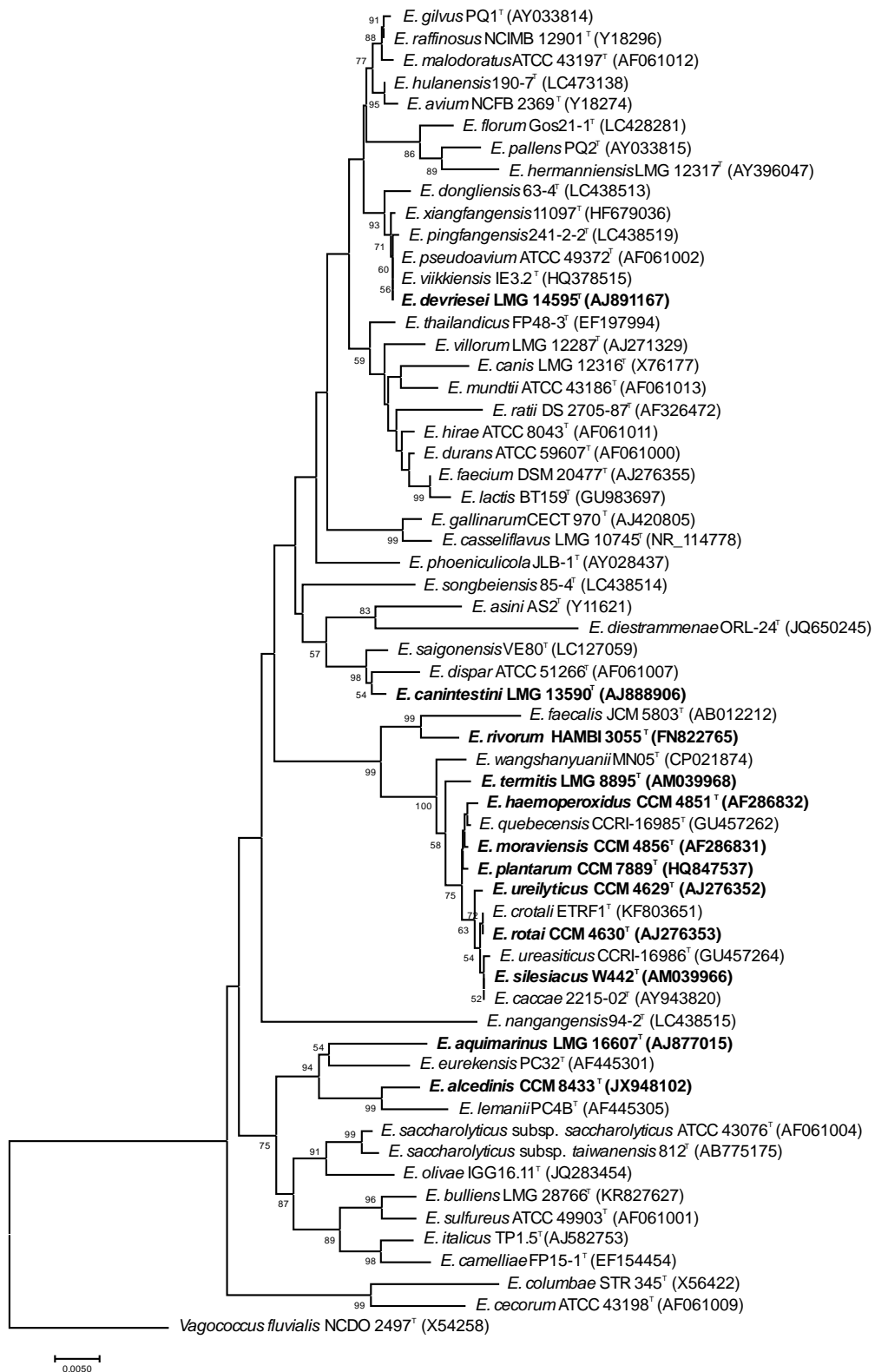
#### **4. Fylogenetická pozice a struktura rodu *Enterococcus***

V současném taxonomickém systému založeném na fylogenetické analýze genu pro 16S rRNA je rod *Enterococcus* typovým rodem čeledi *Enterococcaceae*, která je řazena v řádu *Lactobacillales*, třídě *Bacilli* a kmenu *Firmicutes* (Ludwig a kol., 2009). Mimo rod *Enterococcus*, který je v čeledi *Enterococcaceae* druhově nejpočetnějším rodem, obsahuje tato čeleď dalších šest fylogeneticky příbuzných, ale fenotypově variabilních rodů: *Bavariicoccus*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus* (Parte, 2014, Švec a Franz, 2014b). Enterokokům fylogeneticky nejbližší je rod *Melissococcus*, s jedním druhem *Melissococcus plutonius* (Bailey a Collins, 1982). Jedná se grampozitivní ovoidní koky až krátké tyčky, které na rozdíl od enterokoků nerostou aerobně, ale stejně jako enterokoky produkují skupinový D antigen. *Melissococcus plutonius* je původcem onemocnění včel, tzv. hniloby včelího plodu (Dicks a Holzapfel, 2009). Dalším rodem je *Vagococcus*, zahrnující 17 druhů izolovaných z prostředí, živočichů, i z řady humánních a veterinárních klinických materiálů (Lawson, 2014, Parte, 2014). Druhým početnějším rodem je rod *Tetragenococcus* s 5 druhy, který tvoří typické grampozitivní koky v tetrádách vyskytující se v prostředí s vyšším obsahem soli, jako jsou například fermentované potraviny (Justé a kol., 2014, Parte, 2014). Zbývající zástupci čeledi *Enterococcaceae* jsou rody s jedním

validně popsaným druhem. Je to rod *Bavariicoccus* (*B. seileri*) izolovaný ze sýrů (Schmidt a kol., 2009). Dále rod *Catelllicoccus* (*C. marimammalium*) popsáný z mořských živočichů sviňuchy *Phocoena phocoena* a tuleně *Halichoerius grypus* (Lawson a kol., 2006), který je však také velmi často izolován z výkalů racků (Koskey a kol., 2014, Lu a kol., 2008). Posledním rodem čeledi *Enterococcaceae* je anaerobní rod *Pilibacter* (*P. termitis*) izolovaný ze střeva termitů *Coptotermes formosanus* (Higashiguchi a kol., 2006).

Druhy rodu *Enterococcus* jsou z pohledu vnitrorodového fylogenetického členění na základě sekvence genu pro 16S rRNA rozděleny do několika fylogenetických skupin a část druhů tvoří samostatné fylogenetické linie (Obr. 1). Toto členění na základě genu pro 16S rRNA do značné míry koresponduje také s fylogenezí genů *atpA* (kódujícího alfa podjednotku ATP syntázy) (Naser a kol., 2005a), *rpoA* (kódujícího alfa podjednotku RNA polymerázy) a *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) (Naser a kol., 2005b), genu *ddl* (kódujícího D-alanin:D-alanin ligázu) (Ozawa a kol., 2000), genu *sodA* (kódujícího mangan-dependentní superoxid dismutázu) (Frolková a kol., 2012) i se srovnávací analýzou celogenomových sekvencí enterokoků (Zhong a kol., 2017).

Členění druhů enterokoků do několika fylogenetických skupin popsali Williams a kol. (1991) a Devriese a kol. (1993), kteří také ukázali, že druhy v rámci těchto skupin sdílí některé fyziologické a biochemické znaky využitelné pro jejich fenotypovou diferenciaci. Nejpočetnější fylogenetické skupiny se 14 druhů jsou "skupina *E. faecalis*" (*E. caccae*, *E. crotali*, *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. plantarum*, *E. quebecensis*, *E. rivorum*, *E. rotai*, *E. silesiacus*, *E. termitis*, *E. ureasiticus*, *E. ureilyticus* a *E. wangshanyuanii*) a "skupina *E. avium*" (*E. avium*, *E. devriesei*, *E. dongliensis*, *E. gilvus*, *E. hulanensis*, *E. malodoratus*, *E. pingfangensis*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. viikkiensis*, *E. xiangfangensis* a je možno zde zařadit i tři vzdálenější druhy *E. florum*, *E. hermanniensis* a *E. pallens*). Dále je to s devíti druhy "skupina *E. faecium*" (*E. canis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. lactis*, *E. mundtii*, *E. ratti*, *E. thailandicus* a *E. villorum*). Zbývající skupiny tvoří trojice druhů "skupiny *E. dispar*" (*E. dispar*, *E. canintestini* a nověji popsáný *E. saigonensis*) a dále dvojice druhů "skupiny *E. gallinarum*" (*E. gallinarum* a *E. casseliflavus*), "skupiny *E. italicus*" (*E. italicus* a *E. camelliae*), "skupiny *E. sulfureus*" (*E. sulfureus* s nověji popsáným druhem *E. bulliens*) a poslední "skupiny *E. cecorum*" (*E. cecorum* a *E. columbae*), která je od zbývajících druhů fylogeneticky nejvzdálenější.



**Obř. 1.** Fylogenetická řbřuznost druhů rodu *Enterococcus* zřskanř analřzou sekvencř genů pro 16S rRNA metodou Neighbor-Joining (Saitou a Nei, 1987). Procentuřlnř hodnoty vyřřř neř 50 % pro 1000 opakovanř bootstrapovř analřzy (Felsenstein, 1985) jsou zobrazeny u řřřsluřnřch uzlů fylogenetickřho stromu. Vřechny sekvencřnř pozice s mřnř neř 95% pokrytřm byly vyřřzeny. Evoluřnř analřza byla provedena pomocř programu MEGA 7 (Kumar a kol., 2016). Sekvence kmene *Vagococcus fluvialis* NCD0 2497<sup>T</sup> byla vyuřřita jako kořen stromu. řřřla pouřřitřch sekvencř zřskanř z GenBank databřze jsou uvedena v zřvorkřch. Druhy popsane autorem prřce a diskutovane v rřmci souboru komentovane publikacř jsou zřřraznřne tučně.

## 5. Identifikace zástupců rodu *Enterococcus* pomocí fenotypových metod

Fenotypová charakteristika bakteriálních taxonů je nedílnou součástí jejich validního popisu (Tindall a kol., 2010) a i v dnešní taxonomii využívající především molekulárně-biologické typizační a identifikační techniky představuje důležitou součást našich znalostí o mikroorganismech. Jednotlivé fenotypové znaky za sebou skrývají celou řadu genů, které se promítají do složitě regulovaných metabolických drah, takže je stále velmi obtížné až nemožné předpovědět fenotyp pouze na základě znalosti genotypu (Kämpfer, 2012, 2014). Znalost fenotypu mikroorganismu je i v dnešní, spíše genotypově zaměřené taxonomii, důležitá pro jeho identifikaci pomocí fyziologických a biochemických metod, které jsou stále využívány řadou výzkumných i rutinních pracovišť. Nutno však dodat, že díky rychle rostoucímu počtu známých druhů, existující vnitrodruhové variabilitě fenotypových znaků a z praktického pohledu také díky faktu, že různé fenotypizační techniky mohou poskytovat různé výsledky, je spolehlivá biochemická identifikace řady druhů v dnešní době velmi problematická. To bohužel platí i pro fenotypové odlišení enterokoků od jiných grampozitivních a kataláza negativních koků i pro identifikaci jednotlivých druhů rodu *Enterococcus*.

Enterokoky je možné stručně charakterizovat jako grampozitivní ovoidní koky vyskytující se jednotlivě, ve dvojicích, v krátkých řetězcích i ve shlucích. Jsou nesporulující, některé druhy mohou být pohyblivé a mohou produkovat žlutý pigment. Enterokoky jsou kataláza negativní, ale při kultivaci na médiu s krví mohou vykazovat pozitivní katalázovou reakci (Frankenberg a kol., 2002, Švec a Devriese, 2009). Jsou to fakultativně anaerobní mikroorganismy. Glukózu metabolizují homofermentativním mléčným kvašením, kdy je převládajícím konečným produktem kyselina mléčná. Enterokoky rostou na běžných bohatých kultivačních médiích (např. média s krví, výtažek mozkové a srdeční tkáně (BHI), Todd-Hewittův agar, škrobový agar) v širokém rozmezí teplot s optimem 35 až 37°C a jsou rezistentní k řadě chemických i fyzikálních faktorů (vysoké pH, vysoká teplota, desinfekční látky, vysušení, salinita, UV záření) (Bale a kol., 1993, Byappanahalli a kol., 2012a, Hussain a kol., 2009, Renner a Peters, 1999, Švec a Devriese, 2009, Švec a Franz, 2014a).

Základní odlišující fenotypové charakteristiky rodu *Enterococcus*, které byly popsány již Shermanem (1937) (viz. kapitola 3), jsou schopnost růstu při 10°C, 45°C a v médiu s 6,5 % NaCl a produkce skupinového D antigenu. Další testy využívané pro odlišení rodu *Enterococcus* jsou produkce pyrrolidonylarylamidázy (PYR test), produkce leucinaminopeptidázy (LAP test), hydrolýza eskulinu a růst v přítomnosti žluči (Devriese a kol., 1993, Facklam a Elliott, 1995, Facklam, 2001, Fortin a kol., 2003).

Využití uvedených testů pro rodovou identifikaci má však v dnešní době značná omezení, protože tyto testy nejsou pozitivní u všech druhů a naopak je také nutno brát v potaz, že tyto jednotlivé testy mohou být pozitivní i u řady dalších rodů grampozitivních a kataláza negativních koků (Devriese a kol., 1993, Facklam a Elliott, 1995). Jako příklad jsou dále uvedeny výsledky růstových testů a testu produkce D antigenu, které jsou i v dnešní době často využívány k presumptivní rodové identifikaci. Při 10°C nerostou *E. alcedinis*,

*E. camelliae*, *E. saccharolyticus* subsp. *taiwanensis*, *E. thailandicus* a *E. wangshanyuanii* a při 45°C nerostou *E. alcedinis*, *E. bulliens*, *E. devriesei*, *E. diestrammenae*, *E. dispar*, *E. dongliensis*, *E. hermanniensis*, *E. hulanensis*, *E. nangangensis*, *E. olivae*, *E. pingfangensis*, *E. quebecensis*, *E. rotai*, *E. saccharolyticus* subsp. *taiwanensis*, *E. silesiacus*, *E. songbeiensis*, *E. sulfureus*, *E. ureilyticus*, *E. viikkiensis* a *E. xiangfangensis*. V přítomnosti 6,5 % NaCl nerostou druhy *E. alcedinis*, *E. asini*, *E. camelliae*, *E. cecorum*, *E. diestrammenae*, *E. dongliensis*, *E. hulanensis*, *E. italicus*, *E. nangangensis*, *E. phoeniculicola*, *E. pingfangensis*, *E. pseudoavium*, *E. quebecensis*, *E. songbeiensis*, *E. ureasiticus* a *E. xiangfangensis* a test produkce D antigenu je negativní u druhů *E. alcedinis*, *E. aquimarinus*, *E. canintestini*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. diestrammenae*, *E. dispar*, *E. eurekensis*, *E. hermanniensis*, *E. lemanii*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. saigonensis* a *E. sulfureus*. Mimo to vykazuje u jednotlivých testů řada druhů slabé či variabilní výsledky a u některých, především nověji popsaných druhů, nebyly výsledky těchto testů v literatuře popsány vůbec. Uvedené výsledky testů byly převzaty z citací popisů jednotlivých druhů uvedených v Tabulce 1 a z práce Švece a Franze (2014a).

Pro biochemickou identifikaci enterokoků byla navržena řada identifikačních schémat (Day a kol., 2001, Manero a Blanch, 1999, Teixeira a kol., 2015), ale stejně jako výše diskutovaná identifikace rodová, je i druhová identifikace enterokoků pomocí biochemických metod značně problematická a z taxonomického pohledu značně nespolehlivá. K tomuto přispívá poměrně vysoký počet popsaných druhů, existující vnitrodruhová variabilita fyziologických a biochemických vlastností u kmenů stejného druhu z různých zdrojů (Devriese a kol., 1992a, Švec a kol., 2002), vysoká fenotypová podobnost některých druhů (Devriese a kol., 2002) a v neposlední řadě také fakt, že výsledky řady testů jsou ovlivněny metodou jejich provedení, takže jsou často výsledky publikované různými autory obtížně srovnatelné (Bosshard a kol., 2004, Winston a kol., 2004). Situaci také komplikuje poměrně strohý výčet fenotypových znaků uvedený v popisech některých druhů enterokoků (Carvalho a kol., 2006, McLaughlin a kol., 2017, Teixeira a kol., 2001). Také využití komerčních biochemických identifikačních systémů určených pro identifikaci enterokoků, jako např. EN-COCCUS test (Erba Lachema), API 20 Strep, Rapid ID 32 STREP (BioMérieux), BBL Crystal Gram-Positive ID System (BD Diagnostic Systems), GP24 (Diagnostics) nebo GP2 MicroPlate™ (Biolog) má své limity, protože tyto systémy jsou většinou zaměřeny na identifikaci několika málo vybraných klinicky významných druhů enterokoků. Z výše uvedených důvodů se proto s identifikací enterokoků pouze pomocí biochemických metod v soudobých odborných publikacích prakticky nesetkáváme. Tyto metody jsou buď využívány jen pro presumptivní identifikaci nebo jsou pro zvýšení spolehlivosti výsledků identifikace kombinovány s jinými identifikačními technikami.

Do identifikačních fenotypizačních technik však nepatří jen stanovení biochemických profilů formou testování okyselování substrátů, produkce enzymů či růstových testů, které byly diskutovány výše. Srovnání chemických charakteristik buněk využívá celá řada dalších technik, které se uplatňují jak v odborných taxonomických studiích, tak v rutinní

mikrobiologii. Z těchto technik je v současné době nejrozšířenější hmotnostní spektrometrie s desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem, známá pod zaužívanou zkratkou MALDI-TOF MS (angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), která je založena na analýze hmotnostních spekter proteinů z celých bakteriálních buněk (Murray, 2010, Ryzhov a Fenselau, 2001) a našla uplatnění jak pro rutinní identifikaci bakterií, tak pro vědeckovýzkumnou činnost. Metoda MALDI-TOF MS byla využita pro identifikaci a typizaci enterokoků z humánního klinického materiálu (Holzknecht a kol., 2018, Lee a kol., 2015, Savas a kol., 2019), z veterinárních zdrojů (Santos a kol., 2015, Stepien-Pysniak a kol., 2017, Šplíchalová a kol., 2015), z potravin (Ledina a kol., 2018, Nacef a kol., 2017) i z prostředí (Giebel a kol., 2008, Christ a kol., 2017) a byla také jednou z metod aplikovaných pro taxonomický popis druhu *E. bulliens* (Kadri a kol., 2015). Další fenotypovou technikou, kterou je nutno v rámci této kapitoly zmínit, je analýza celkových buněčných proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), jejíž výsledky dobře korelovaly s výsledky DNA-DNA hybridizace, a která byla aplikována i v popisech nových druhů enterokoků (Merquior a kol., 1994, Švec a Devriese, 2009). Od této metody se však v dnešní době již prakticky upustilo, protože byla pracná a obtížně standardizovatelná a reprodukovatelná. Další využívanou identifikační technikou je analýza methylesterů mastných kyselin buněčné stěny pomocí plynové chromatografie (FAME analysis, angl. Fatty Acid Methyl Ester analysis), která byla použita pro popis druhů *E. gilvus* a *E. pallens* (Tyrrell a kol., 2002), *E. italicus* (Fortina a kol., 2004), *E. lemanii* a *E. eurekensis* (Cotta a kol., 2013), *E. diestrammenae* (Kim a kol., 2013), *E. xiangfangensis* (Li a kol., 2014), *E. saigonensis* (Harada a kol., 2016) a *E. dongliensis*, *E. hulanensis*, *E. nangangensis*, *E. pingfangensis* a *E. songbeiensis* (Li a Gu, v tisku). Mimo tyto taxonomické práce je však také aplikována pro identifikaci a typizaci enterokoků z humánních i veterinárních zdrojů (Duran a kol., 2009), z potravin (Lang a kol., 2001) i z prostředí (Genthner a kol., 2005). Mezi další metody chemicko-analytické instrumentace, které byly použity pro identifikaci a typizaci enterokoků, patří například infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR, angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (Goodacre a kol., 1996, Samelis a kol., 2011, Sandt a kol., 2006, Wenning a kol., 2010), Ramanova spektroskopie (Kirschner a kol., 2001, Top a kol., 2007) nebo protonová magnetická rezonance (Bourne a kol., 2001). Ačkoliv tyto techniky zatím nebyly z taxonomického pohledu dostatečně evaluovány pro identifikaci a typizaci širšího spektra známých druhů enterokoků, jejich další rozvoj představuje slibný potenciál využitelný do budoucna pro identifikaci a typizaci mikroorganismů (Quintelas a kol., 2018, Willemse-Erix a kol., 2011).

## 6. Identifikace zástupců rodu *Enterococcus* pomocí genotypových metod

Pro identifikaci druhů rodu *Enterococcus* byla v literatuře popsána široká škála metod založených na analýze DNA, které jsou využívány jak v taxonomických studiích, tak v pracích zabývajících se identifikací zástupců tohoto rodu z různých zdrojů. Řada z těchto metod byla popsána v různých modifikacích, aplikována na různě velké skupiny kmenů a různé druhy a

využita pro účely taxonomického popisu, identifikace i typizace. Z toho důvodu by bylo nad rámec a rozsah této práce popsat vyčerpávajícím způsobem všechny techniky analýzy DNA, které byly pro charakterizaci enterokoků aplikovány. Uvedeny jsou zde proto především ty metody, se kterými se v odborných studiích můžeme setkat nejčastěji. Pro každou metodu je také uvedeno jen několik vybraných citací, které dokladují její využití pro charakterizaci enterokoků.

Pravděpodobně nejčastěji využívanou metodou pro klasifikaci a identifikaci bakterií je stanovení celé nebo částečné sekvence genu pro 16S rRNA, které je také standardní součástí popisu nových taxonů. Diskriminativnost této metody má však své omezení díky vysoké vzájemné podobnosti tohoto genu mezi některými druhy, a to platí i pro rod *Enterococcus*. Především druhy v rámci jednotlivých fylogenetických skupin, popsaných v kapitole 4 této práce, vykazují často podobnost vyšší než 99 % a mohou dosáhnout až 100% podobnosti, jako je to v případě druhů *E. crotali* a *E. rotai* (McLaughlin a kol., 2017). Mezi další specifické geny, které byly využity k identifikaci enterokoků patří gen *atpA* (kódující alfa podjednotku ATP syntázy) (Naser a kol., 2005a), geny *rpoA* (kódující alfa podjednotku RNA polymerázy) a *pheS* (kódující alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) (Naser a kol., 2005b), gen *ddl* (kódující D-alanin:D-alanin ligázu) (Ozawa a kol., 2000), gen *cpr60* (kódující chaperonin 60) (Vermette a kol., 2010), gen *Tuf* (kódující elongační faktor EF-Tu) (Ke a kol., 1999), geny *GroESL* (kódující 10 kDa GroES a 60 kDa GroEL proteiny indukované teplem, z angl. heat shock proteins) (Sanderson a kol., 2019, Tsai a kol., 2005, Zaheer a kol., 2012), gen *sodA* (kódující mangan-dependentní superoxid dismutázu) (Frolková a kol., 2012, Poyart a kol., 2000) nebo doména V genu pro 23S rRNA (Tsiodras a kol., 2000).

Mimo sekvenční techniky byla pro identifikaci i kmenovou typizaci enterokoků aplikována také řada fingerprintových metod založených na analýze profilů PCR produktů nebo restrikčních fragmentů DNA. K metodám využívajícím PCR patří například ITS-PCR (z angl. Internal Transcribed Spacer) (Alves a kol., 2004, Pangallo a kol., 2008, Tyrrell a kol., 1997), RAPD-PCR (z angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Cocconcelli a kol., 1995, Cosentino a kol., 2004, Quednau a kol., 1998), tDNA-PCR (z angl. tRNA intergenis spacer PCR) (Baele a kol., 2000) nebo metody rep-PCR s primery (GTG)<sub>5</sub> (Jurkovic a kol., 2006b, Švec a kol., 2005c), REP (Pangallo a kol., 2008) nebo BOX (Nayak a kol., 2011). Metody založené na analýze restrikčních fragmentů představuje například přímá analýza restrikčního profilu celkové DNA (Hall a kol., 1992, Lacoux a kol., 1992), analýza restrikčního profilu genu pro 16S rRNA (Jayarao a kol., 1992) či analýza makrorestrikčních profilů metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE, z angl. Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Bopp a kol., 1999, de Freitas a kol., 2018, Dicuonzo a kol., 2001), která je jednou z klasických metod využívaných pro kmenovou typizaci bakterií (Lopez-Canovas a kol., 2019). Dále je to ribotypizace založená na selektivní hybridizaci a následné detekci restrikčních fragmentů nesoucích geny kódující ribozomální RNA (Björkroth a kol., 2005, Descheemaeker a kol., 1997, Lang a kol., 2001, Švec a kol., 2001b). K dalším metodám založeným na analýze DNA patří metody hybridizace se specifickými sondami (Behr a kol., 2000, Betzl a kol., 1990) a jejich aplikace ve formě DNA



čipů (Lehner a kol., 2005, Sango a kol., 2013). Většina z výše uvedených fingerprintových metod diferencuje enterokoky na úrovni druhu až kmene, a to v závislosti na analyzovaném taxonu i na podmínkách provedení (např. na použitém restričním enzymu, primeru nebo sondě), takže jsou tyto techniky využívány jak pro kmenovou diferenciaci, tak pro identifikaci.

### 6.1. Charakteristika genomu zástupců rodu *Enterococcus*

Sekvenční a srovnávací analýza genomů bakterií je v současné době jednou z klíčových metod formujících obor taxonomie. Z pohledu základního taxonomického výzkumu je analýza bakteriálních genomů nezbytná především pro popis nových taxonů a jejich fylogenetické začlenění v současném taxonomickém systému (Chun a kol., 2018). Znalost celého genomu však také nalézá uplatnění například při charakterizaci a typizaci mikroorganismů pro studium ekologie, epidemiologie, virulence nebo metabolismu, či při hledání nových genů, enzymů a bioproduktů vhodných pro biotechnologické využití. Aplikace celogenomového sekvencování pro identifikaci mikroorganismů již také začíná pronikat i do rutinních laboratoří (Kozyreva a kol., 2017, Mathijs a kol., 2016, Rantsiou a kol., 2018).

Genomy zástupců rodu *Enterococcus* popsané v literatuře patří především k nejčastěji izolovaným druhům *E. faecalis* (Bourgogne a kol., 2008, Domann a kol., 2007, Paulsen a kol., 2003, Zischka a kol., 2012) a *E. faecium* (Lam a kol., 2012, Qin a kol., 2012, Suárez a kol., 2013, van Schaik a kol., 2010). Tato situace se odráží také v internetových databázích, jako jsou například databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nebo PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>). V databázi PATRIC je aktuálně (červen 2019) celkem 2826 genomů rodu *Enterococcus*, z čehož 1594 patří druhu *E. faecium* a 856 druhu *E. faecalis*. V databázi NCBI je to k výše uvedenému datu 2988 genomů enterokoků zahrnujících 1583 kmenů *E. faecium* a 1012 *E. faecalis*.

Srovnávací genomická analýza 37 kmenů *Enterococcus* spp. ukázala, že průměrná velikost genomu enterokoků je 3,20 Mb, ale různé druhy mají velikost v rozsahu od 2,31 Mb (*E. sulfureus*) do 5,27 Mb (*E. pallens*) (Zhong a kol., 2017). První celogenomová sekvence zástupce rodu *Enterococcus* byla publikována Paulsenem a kol. (2003), kteří analyzovali vankomycin rezistentní klinický kmen *E. faecalis* V583. Jeho genom obsahoval řadu genů pro faktory virulence a mnoho mobilních elementů, které představovaly více než čtvrtinu jeho celkové délky. Naopak další popsaný genom probiotického kmene *E. faecalis* Symbioflor 1 řadu genů pro faktory virulence postrádá (Domann a kol., 2007). Druhým druhem, u kterého byl popsán celý genom, byl *E. faecium* Aus0004 izolovaný z krve pacienta v Melbourne (Lam a kol., 2012). I u tohoto kmene byla popsána řada genů pro faktory virulence a vysoký podíl (38 %) mobilních elementů. Značnou variabilitu genomů enterokoků z pohledu velikosti, přítomnosti mobilních elementů i genů virulence a rezistence k antibiotikům popsali také další autoři, kteří charakterizovali klinicky relevantní kmeny (Lam a kol., 2012, van Schaik a kol., 2010), komenzální kmeny (Brede a kol., 2011, Dolka a kol., 2015, Solheim a kol., 2009,

Zischka a kol., 2012) i kmeny z potravin (Magni a kol., 2012, Suárez a kol., 2013). Analýza celogenomových sekvencí v rutinních klinických laboratořích byla již také využita pro identifikaci (Hasman a kol., 2014, Tsai a kol., 2017) i pro epidemiologickou typizaci enterokoků (Raven a kol., 2017, Reuter a kol., 2013).

## 7. Ekologie rodu *Enterococcus*

Enterokoky představují kosmopolitní mikroorganismy, které můžeme izolovat ze sladkovodního i z mořského prostředí, a to přímo z vody, ze sedimentů i z vodních rostlin a živočichů. Osídlují však také suchozemské habitaty, kde je nalézáme v půdách, na rostlinách a především jsou součástí mikrobioty řady mnohobuněčných organismů, od bezobratlých až po člověka. Enterokoky jsou také součástí mnoha potravin rostlinného i živočišného původu. Za primární habitat enterokoků je obecně považován trávicí trakt suchozemských živočichů. Řada studií diskutovaných v následujících kapitolách však ukazuje, že v dalších výše zmíněných prostředích nejsou enterokoky jen tranzitní mikrobiotou, ale jsou schopni zde metabolizovat a aktivně se množit. Schopnost enterokoků osídlit tak široké spektrum habitatů je dávana do souvislosti s jejich evolučním vývojem. Ve své ekologicko-evoluční studii datují Lebreton a kol. (2017) objevení se enterokoků a jejich diverzifikaci do souvislosti s přechodem mnohobuněčných organismů na souš před 425-500 miliony let a s jejich evolucí v tomto novém prostředí. Díky vysoké odolnosti k vysychání, hladovění i nepříznivým fyzikálním a chemickým faktorům vnějšího prostředí, jsou enterokoky dokonale přizpůsobeny pro přežití, šíření a osídlení různých terestrických habitatů. Současné znalosti o výskytu a diverzitě *Enterococcus* spp. v uvedených habitatech jsou shrnuty v následujících podkapitolách.

### 7.1. Voda

Voda a vodní prostředí představují bohatý zdroj enterokoků. Enterokoky nalézáme ve vodách sladkých i slaných (Moore a kol., 2008), čistých, znečištěných i ve vodách odpadních (Byappanahalli a kol., 2012a, Laukova a Juris, 1997, Niemi a kol., 1993, Sanderson a kol., 2019). Ve vodním prostředí se mohou buňky enterokoků vyskytovat volně ve vodním sloupci, ale v největších koncentracích jsou nalézány na povrchu vodních rostlin i živočichů, které zahrnují jak planktonní organismy, tak vyšší vodní rostliny a živočichy (Anderson a kol., 1997, Maugeri a kol., 2004, Signoretto a kol., 2004). Významným zdrojem enterokoků jsou také vodní sedimenty a pobřežní písky, kde se také mohou enterokoky v příznivých podmínkách množit (Cui a kol., 2013, Ferguson a kol., 2005, Yamahara a kol., 2009).

Přítomnost enterokoků typických pro trávicí trakt živočichů a člověka ve vodách je považována za indikátor fekálního znečištění a stanovení jejich počtu ve vzorcích vod je jedním z rutinních testů pro stanovení kvality vody. Testování kvality vody v České republice upravuje norma ČSN EN ISO 7899, která definuje kultivační metody stanovení tzv.

intestinálních enterokoků ve vodách. Tato skupina je definována jako typické intestinální druhy *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. hirae* a dále *Streptococcus equinus* (Baudišová, 2017). Tyto metody stanovení však detekují také přítomnost nefekálních enterokoků typicky asociovaných s rostlinami (*E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. sulfureus*), takže je při hodnocení výsledků stanovení nutno přihlídnout i k tomuto faktu. Mimo klasických kultivačních metod byly pro detekci enterokoků ve vodě popsány metody využívající kvantitativní (real-time) PCR (Haugland a kol., 2005) či imunomagnetickou separaci s ATP bioluminiscencí (Lee a Deininger, 2004, Zimmer-Faust a kol., 2014). Jejich využití v rutinním testování je však zatím problematické díky cenové náročnosti technického vybavení a reagensů i vysokým požadavkům na obsluhu. Pro rozlišení fekální kontaminace humánního a živočišného původu bylo navrženo stanovení druhového spektra druhů rodu *Enterococcus* (Wheeler a kol., 2002), stanovení poměru jejich počtu k dalším indikátorovým mikroorganismům *Escherichia coli* a *S. equinus* (Pourcher a kol., 1991) i stanovení metabolických profilů enterokoků a *E. coli* specifických pro hostitele (Ahmed a kol., 2005). V rutinních laboratořích testujících kvalitu vody však tyto metody prakticky využitelné nejsou, protože zde není druhové spektrum izolovaných bakteriálních kmenů stanovováno.

Druhové spektrum enterokoků ve vodách bylo na základě identifikace kmenů izolovaných z různých zdrojů vod popsáno dlouhou řadou autorů. Nejčastěji jsou izolováni zástupci druhů *E. faecalis* a *E. faecium*, které následují *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* a *E. mundtii* (Ferguson a kol., 2005, Luczkiewicz a kol., 2010, Maraccini a kol., 2012, Moore a kol., 2008, Pinto a kol., 1999, Sanderson a kol., 2019). Voda byla také zdrojem kmenů řady nověji popsaných druhů enterokoků (Niemi a kol., 2012, Sedláček a kol., 2013, Sístek a kol., 2012, Švec a kol., 2001a, Švec a kol., 2005a, Švec a kol., 2006), jejichž rozšíření v prostředí či v živočišných nebylo doposud uspokojivě zmapováno.

## 7.2. Rostliny

První práce popisující výskyt enterokoků na suchozemských rostlinách publikoval Mundt (1961, 1963a, 1975), který tyto mikroorganismy považoval za přechodnou mikroflóru rostlin pocházející z divokých zvířat, kam jsou přenášeny prostřednictvím větru a hmyzu. Ukázal však také, že jsou enterokoky schopné se na povrchu rostlin množit (Mundt a kol., 1962). Müller a kol. (2001) a Ott a kol. (2001) identifikovali na rostlinách zástupce druhů *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* a *E. sulfureus*, ale více než polovinu kmenů izolovaných v jejich studiích tvořily v té době nepopsané druhy rodu *Enterococcus*. Užitkové rostliny zahrnující rajčata, ředkvičky, petržel, hlávkový salát, špenát, kapustu, hlávkové zelí, celer, či melouny jsou osídleny druhem *E. casseliflavus* a typickými intestinálními druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, které pravděpodobně pocházejí z vody či přírodních hnojiv používaných v zemědělství (Hölzel a kol., 2010, Johnston a Jaykus, 2004, Johnston a kol., 2006, McGowan a kol., 2006). Z různých rostlinných zdrojů byly však izolovány i další druhy. *Enterococcus faecium*, *E. durans* a *E. avium* byly izolovány z hroznů vinné révy (Barata a kol.,

2012), *E. cacae* a *E. hirae* z dlouhodobě skladovaných zrn ječmene (Olstorpe a kol., 2010) či *E. mundtii* ze semen eukalyptu (Ferreira a kol., 2008). Na základě studia kmenů izolovaných z rostlin byly také nově popsány druhy *E. plantarum* (Švec a kol., 2012), *E. ureilyticus* a *E. rotai* (Sedláček a kol., 2013), *E. florum* (Techo a kol., 2019) nebo poddruh *E. saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* (Chen a kol., 2013a). Nové druhy byly popsány také z fermentovaných rostlinných produktů. Tyto představují *E. camelliae* z fermentovaných čajových listů (Sukontasing a kol., 2007), *E. xiangfangensis* z nakládané zeleniny (Li a kol., 2014), *E. olivae* z fermentovaných zelených oliv (Lucena-Adrós a kol., 2014) nebo druhy *E. dongliensis*, *E. hulanensis*, *E. nangangensis*, *E. pingfangensis* a *E. songbeiensis* z kysaného Čínského zelí (Li a Gu, v tisku). Zda-li jsou tyto taxony typickou součástí mikroflóry rostlin nebo se jedná jen o kontaminující či přechodnou mikroflóru z jiných zdrojů však není možno na základě těchto popisných prací určit.

Stejně jako rostliny suchozemské jsou kmeny rodu *Enterococcus* osídleny i rostliny vodní, a také na vodních rostlinách jsou enterokoky schopné nejen dlouhodobě přežít, ale také se aktivně množit (Byappanahalli a kol., 2003, Grant a kol., 2001, Whitman a kol., 2003). Enterokoky byly ve vysokých koncentracích izolovány z řas (Whitman a kol., 2003), chaluh (Anderson a kol., 1997) i vyšších vodních rostlin (Badgley a kol., 2010b, 2010a) a zahrnovaly druhy *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* a *E. mundtii*.

### 7.3. Půda

S ohledem na výskyt a variabilitu enterokoků patří půda k málo prozkoumaným habitatům. Výsledky publikovaných studií ukazují, že se enterokoky v půdách vyskytují, ale jsou zde přítomny v nízkých množstvích (Byappanahalli a Fujioka, 2004, Desmarais a kol., 2002, Medrek a Litsky, 1960, Mundt, 1961). Do půd jsou enterokoky přirozeně importovány z rostlin i živočichů, kdy významnou roli přirozeně hraje fekální kontaminace či využití chlévské mrvy v zemědělství (Mundt, 1961, Stocker a kol., 2015). Enterokoky však nejsou jen přechodnou složkou půdního ekosystému. V závislosti na chemických a fyzikálních vlastnostech půd a na vnějších podmínkách prostředí jsou kmeny enterokoků schopny zde přežít a množit se (Stocker a kol., 2015, Van Donsel a kol., 1967). Jejich ubikvitní rozšíření v půdách naznačuje, že půdy obsahují autochtonní populace enterokoků přizpůsobené tomuto habitatu (Byappanahalli a kol., 2012b). Jejich počty zde mohou být významné z pohledu standardů testování kvality vody, která tak může obsahovat půdní enterokoky nefekálního původu (Desmarais a kol., 2002, Fujioka a kol., 1998, Hardina a Fujioka, 1991).

### 7.4. Živočichové a člověk

Trávicí trakt bezobratlých živočichů, obratlovců i člověka představuje habitat bohatě osídlený enterokoky. Taxonomická diverzita enterokoků izolovaných z živočichů je pestrá a řada druhů byla nově popsána právě studiem kmenů z těchto zdrojů.

V rámci studia mikroflóry bezobratlých živočichů byly enterokoky izolovány např. ze střeva hlemýžďů rodů *Helix* a *Cornu* (Charrier a kol., 1998, Charrier a kol., 2006, Švec a kol., 2002), z komárů *Culex quinquefasciatus* (Chandel a kol., 2013), *Culiseta melanura* a *Coquillettidia perturbans* (Andrews a kol., 2014), octomilek *Drosophila* (Adair a kol., 2018, Wong a kol., 2013), kříška *Amrasca biguttula biguttula* (Sivakumar a kol., 2016, Sivakumar a kol., 2017), blech a vši (Murrell a kol., 2003), dvoukřídlého hmyzu rodu *Bactrocera* (Andongma a kol., 2015, Yong a kol., 2019), larev blýskavky (*Spodoptera littoralis*) a černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*) (Tang a kol., 2012), termitů (Bauer a kol., 2000, Brune a Friedrich, 2000, Švec a kol., 2006), larev bource morušového (*Bombyx mori*) (Fei a kol., 2006), mouchy domácí (*Musca domestica*) (Macovei a Zurek, 2006), mouchy tse-tse (*Glossina palpalis palpalis*) (Geiger a kol., 2009) a z řady dalších zástupců hmyzu živícího se nektarem, sukulentními částmi rostlin či žijícího v půdě (Martin a Mundt, 1972) nebo z různých druhů hmyzu škodícího na potravinách (Channaiah a kol., 2010).

Enterokoky jsou běžnou a početnou součástí mikroflóry vodních i suchozemských obratlovců a pro mnohé druhy enterokoků je jejich trávicí trakt považován za primární habitat, odkud se šíří do prostředí či potravin. Bohaté osídlení obratlovců enterokoky popsal již Mundt (1963b), který je izoloval ze 71 % vzorků z 216 výkalů divokých savců, z 86 % ze 70 vzorků výkalů plazů a z 32 % z 22 vzorků výkalů divokých ptáků. Frekventovaný výskyt enterokoků ve vzorcích z různých živočišných druhů z různých taxonomických skupin potvrdily, a stále potvrzují, další studie. Mezi zástupce vodních živočichů, ze kterých byly enterokoky izolovány, patří například kapr obecný (*Cyprinus carpio*) (Hagi a Hoshino, 2009), sladkovodní krevety *Macrobrachium rosenbergii* (Cai a kol., 1999), delfin skákavý (*Tursiops truncatus*) (Diaz a kol., 2013) a řada mořských ryb (Cahill, 1990, Romalde a kol., 1996). Dále byly enterokoky izolovány z žab skokana volského (*Rana catesbeiana*) (Pasteris a kol., 2009), skokana lesního (*Rana sylvatica*) (Rana a kol., 2011) a rosničky japonské (*Hyla japonica*) (Benno a kol., 1992), z varana komodského (*Varanus komodoensis*) (Montgomery a kol., 2002), kobry indické (*Naja naja*) (Panda a kol., 2018), ze zástupců ptáků, které reprezentují například holub (Baele a kol., 2002, Radiměřský a kol., 2010), dudek chocholatý (Soler a kol., 2008), racek (Layton a kol., 2010, Lu a kol., 2008, Oravcova a kol., 2017), husa velká (*Anser anser*) (Taučer-Kapteijn a kol., 2017), papoušek amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*) (de Freitas a kol., 2018), vrána americká (*Corvus brachyrhynchos*) (Oravcova a kol., 2014), káně lesní (*Buteo buteo*) (Radhouani a kol., 2010) a dalších 25 druhů divokých ptáků (Stepien-Pysniak a kol., 2017) nebo 35 druhů stěhovavých ptáků (Leon-Sampedro a kol., 2019). Savci, ze kterých byly enterokoky izolovány jsou například vydra říční (*Lutra lutra*) (Semedo-Lemsaddek a kol., 2013), norník rudý (*Clethrionomys glareolus*), myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*) a jezevec lesní (*Meles meles*) (Mallon a kol., 2002), lachtani a tuleni (Layton a kol., 2010), liška obecná (*Vulpes vulpes*) (Radhouani a kol., 2013, Taučer-Kapteijn a kol., 2017), bizoni (*Bison bison*) (Anderson a kol., 2008) nebo opice malpa hnědá (*Cebus apella*) a kosman černovousý (*Callithrix penicillata*) (Xavier a kol., 2010).

Většina studií popisujících enterokoky z živočišných druhů se však zaměřuje na zvířata svázaná s člověkem, ať už jsou to zvířata domácí či hospodářská. Enterokoky z hospodářských zvířat mohou kontaminovat potraviny živočišného původu a způsobovat jejich kažení (Franz a Holzapfel, 2004) a zvířata mohou být i zdrojem kmenů enterokoků rezistentních k antibiotikům (Butaye a kol., 1999, Damborg a kol., 2009, de Jong a kol., 2018, Moyaert a kol., 2006) nebo kmenů nesoucích geny virulence (Olsen a kol., 2012, Pillay a kol., 2018), které tak mohou přecházet do lidské populace a představovat riziko pro lidské zdraví (Hammerum, 2012). Druhy *E. faecalis* a *E. faecium* jsou nejčastějšími enterokoky izolovanými z domácích i hospodářských zvířat (De Graef a kol., 2005, de Jong a kol., 2018, Devriese a kol., 1987, Devriese a kol., 1992b, Devriese a kol., 1992a, Lauková a kol., 2008, Linaje a kol., 2004). V různých druzích domácích a hospodářských zvířat však nalézáme i další enterokoky, které mohou být pro své hostitele typické. Tímto případem je například *E. cecorum*, který je dominantním druhem trávicího traktu drůbeže (Devriese a kol., 1991), *E. canis* a *E. canintestini*, kteří jsou typicky izolováni ze psů (De Graef a kol., 2003, De Graef a kol., 2005, **Naser a kol., 2005c**), *E. columbae* z trávicího traktu holubů (Baele a kol., 2002) nebo *E. hirae*, který byl popsán jako nejčastější druh izolovaný z dojnic (Jackson a kol., 2011).

Stejně jako z rostlin a z vody, byla řada nových druhů enterokoků izolována přímo z živočichů nebo z prostředí svázaných s živočichy. Z nověji popsaných druhů jsou to například *E. villorum* z případů průjmu selat (Vancanneyt a kol., 2001), *E. lemanii* a *E. eurekensis* z chlévské mrvy prasat (Cotta a kol., 2013) *E. rattii* z průjmu krys (Teixeira a kol., 2001), *E. canis* (De Graef a kol., 2003), *E. canintestini* (**Naser a kol., 2005c**) a *E. hermanniensis* (Koort a kol., 2004) ze psů, *E. devriesei* z krav a potravin živočišného původu (**Švec a kol., 2005b**), *E. termitis* z termitů (**Švec a kol., 2006**), *E. diestrammenae* z kobylky *Diestrammena coreana* (Kim a kol., 2013), *E. phoeniculicola* z dudkovce stromového (*Phoeniculus purpureus*) (Law-Brown a Meyers, 2003), *E. alcedinis* z ledňáčka říčního (**Frolková a kol., 2013**), *E. bulliens* (Kadri a kol., 2015) z velbloudího mléka, *E. asini* z osla domácího (de Vaux a kol., 1998), *E. wangshanyuanii* z trusu jaha domácího (Jin a kol., 2017), *E. crotali* z trusu chřestýše *Crotalus horridus* (McLaughlin a kol., 2017) nebo *E. viikkiensis* (Rahkila a kol., 2011) a *E. saigonensis* (Harada a kol., 2016) izolované z drůbežích produktů.

Lidé jsou podobně jako živočichové osídleni enterokoky v průběhu celého svého života a komenzální kmeny enterokoků jsou pravděpodobně jedny z prvních bakterií, se kterými se každý lidský jedinec setkává. Enterokoky byly izolovány z krve z pupečnickové šňůry novorozenců po porodu císařským řezem (Jiménez a kol., 2005), ze smolky (Jiménez a kol., 2008, Nagpal a kol., 2016) a jsou jedny z prvních mikroorganismů osídlujících náš trávicí trakt (Nagpal a kol., 2017) i kůži (Younge a kol., 2018). Komenzální kmeny enterokoků jsou také dominantní součástí mikroflóry mleziva a mateřského mléka (Collado a kol., 2009, Reis a kol., 2016, Taweerodjanakarn a kol., 2019), které tak přispívají k jejich kolonizaci trávicího traktu kojeneckých dětí (Martín a kol., 2003, Solís a kol., 2010). Původ těchto kmenů v mateřském mléce je však zatím nejasný. Roli zde může hrát jak možná kolonizace mléka endogenními kmeny matky, tak sekundární kontaminace z kůže prsu (Dicks a kol., 2018, Jost

a kol., 2014, Rodríguez, 2014, Ruiz a kol., 2019). Druhy *E. faecalis* a *E. faecium* jsou také běžnou součástí mikroflóry trávicího traktu dospělých lidí, kdy v 1 g stolice člověka je přítomno  $10^5$  až  $10^7$  buněk *E. faecalis* a  $10^4$  až  $10^5$  buněk *E. faecium*. Poměr zastoupení těchto dvou druhů se však může v závislosti na studované skupině osob lišit v důsledky typu stravy a environmentálních faktorů (Devriese a Pot, 1995, Fisher a Phillips, 2009, Chenoweth a Schaberg, 1990). Kromě druhů *E. faecalis* a *E. faecium* byly z trávicího traktu člověka izolovány také *E. asini*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium* a *E. saccharolyticus*, ale izolace těchto dalších druhů enterokoků z humánního klinického materiálu je ve srovnání s dominantními druhy *E. faecalis* a *E. faecium* málo častá (Rajilić-Stojanović a de Vos, 2014). Mimo trávicí trakt, který je primárním a dominantním rezervoárem enterokoků v těle člověka, jsou tyto mikroorganismy izolovány také z ústní dutiny a z vaginy (Chenoweth a Schaberg, 1990, Nami a kol., 2018, Perkowski a kol., 2019, Sharma a kol., 2018). V případě ústní dutiny však není jasné, nejedná-li se pouze o přechodnou součást mikroflóry pocházející z potravin, protože jejich výskyt v ústní dutině není konzistentní (Aas a kol., 2005, Zehnder a Guggenheim, 2009).

Z humánního klinického materiálu byly nově popsány druhy *E. gilvus* ze žluči pacienta se zánětem žlučníku a *E. pallens* z infekce peritonea po perforaci střev (Tyrrell a kol., 2002), dále *E. caccae* ze stolice zdravého člověka (Carvalho a kol., 2006) a zatím nevalidovaný druh *E. timonensis* izolovaný ze sputa zdravého muže (Mbogning Fonkou a kol., 2019).

## 7.5. Potraviny

Vzhledem k bohatému výskytu enterokoků v prostředí, na rostlinách i v živočiších je nasnadě, že jsou také častými mikroorganismy vyskytujícími se v potravinách rostlinného i živočišného původu. Obecně je výskyt enterokoků v potravinách považován za kontaminaci z živočišných zdrojů nebo z prostředí (Giraffa, 2002) a tyto kmeny zde mohou mít jak pozitivní, tak negativní vliv na výslednou potravinu (Franz a kol., 2002).

Maso bývá kontaminováno enterokoky z trávicího traktu jatečných zvířat již v době porážky. K dominantním druhům izolovaným z masa a masných výrobků proto patří typicky intestinální druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, které byly izolovány z čerstvého vepřového (Knudtson a Hartman, 1993), hovězího (Stiles a kol., 1978) i drůbežího (Turtura a Lorenzelli, 1994) masa a *E. faecalis* byl také převládajícím druhem v mase ryb (Hammad a kol., 2014). Díky své toleranci k vyšším teplotám mohou enterokoky přežívat v tepelně opracovaných masných výrobcích (uzené maso, šunka, konzervy, krevety) a podílet se na jejich kažení (Bell a Gill, 1982, Correia Santos a kol., 2017, Dalgaard a kol., 2003, Vasilopoulos a kol., 2008). Enterokoky jsou také součástí řady sušených a fermentovaných masných výrobků (např. fuet, chorizo) vyráběných tradičně v Itálii, ve Španělsku nebo v Řecku (Cocolin a kol., 2001, Martín a kol., 2009, Paramithiotis a kol., 2008).

Mléko a mléčné výrobky obsahují kmeny enterokoků, které jsou stejně jako v případě masa považovány za kontaminanty pocházející především ze struků, z dojícího zařízení a skladovacích nádob na mléko nebo z prostředí (Garg a Mital, 1991, Kagkli a kol., 2007, Quigley a kol., 2013). Enterokoky rostoucí v širokém rozmezí teplot, salinity i pH přežívají dlouhodobou pasteraci mléka prováděnou při nižších teplotách a přechází tak do řady mléčných výrobků. Typicky je nalézáme v různých druzích měkkých i tvrdých regionálních sýrů, kde často představují jednu z dominantních složek mikroflóry (Franz a kol., 1999). Převažující druhy izolované z mléka a mléčných výrobků jsou *E. faecalis* a *E. faecium*, ale kromě nich byly v literatuře z mléčných produktů popsány i další druhy enterokoků, jako například *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. gilvus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus* nebo *E. pseudoavium* (Abriouel a kol., 2008, Alves a kol., 2004, Colombo a kol., 2010, Cosentino a kol., 2004, Jurkovic a kol., 2006a, Martín-Platero a kol., 2009, Ortigosa a kol., 2008, Zago a kol., 2009).

Kromě masných a mléčných výrobků byly enterokoky izolovány ze sušených a mražených potravin (ovoce, zelenina, obilniny, vejce, koření) (Mundt, 1976), z tradičních fermentovaných plžů *Batillaria zonalis* na Taiwanu (Chen a kol., 2012), nakládané zeleniny (Li a kol., 2014), kysaného zelí (Li a Gu, v tisku), fermentované brokolice (Chen a kol., 2013b) či fermentovaného čiroku (Yousif a kol., 2005).

Novými druhy enterokoků popsanými v posledních letech z potravin jsou *E. saigonensis* (Harada a kol., 2016), *E. viikkiensis* (Rahkila a kol., 2011) a *E. hermanniense* (Koort a kol., 2004) z kuřecího masa, *E. bulliens* z velbloudího mléka (Kadri a kol., 2015) a druhy *E. italicus* a *E. lactis* z italských sýrů (Fortina a kol., 2004, Morandi a kol., 2012).

## 8. Klinický význam rodu *Enterococcus*

Enterokoky jsou typické oportunně patogenní mikroorganismy, které jsou významnými původci široké škály infekcí člověka. Zdrojem infekce mohou být jak vlastní komenzální kmeny pacienta osídlující trávicí trakt (tzv. endogenní infekce), tak kmeny enterokoků získané exogenní cestou z prostředí nebo z živočichů (Arias a Murray, 2012, Chenoweth a Schaberg, 1990, Teixeira a kol., 2015). Enterokoky jsou nejčastěji izolovány z infekcí močových cest, krevního řečiště, endokardu, žlučových cest, dutiny břišní, popálenin a pooperačních ran, z infekcí vznikajících v souvislosti s dlouhodobě zavedenými zdravotnickými pomůckami, jako jsou například katétrů nebo porty, a celkově jsou jedněmi z nejvýznamnějších původců infekcí nozokomiálních (Fisher a Phillips, 2009, Jett a kol., 1994, Teixeira a kol., 2015). European Centre for Disease Prevention and Control (2018a, b) uvádí ve své zprávě za rok 2016 enterokoky jako druhé nejčastější původce nozokomiálních infekcí močového traktu a pooperačních ran a třetí nejčastější původce nozokomiálních infekcí krevního řečiště u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Také v USA představují enterokoky druhé nejčastější původce nozokomiálních infekcí. K jejich roli významných nozokomiálních patogenů přispívá jak jejich ubikvitní rozšíření, tak jejich vysoká rezistence k



fyzikálním i chemickým faktorům vnějšího prostředí a vysoká genomová plasticita, která umožňuje rychlé šíření genů rezistence a virulence mezi enterokoky (Arias a Murray, 2012, García-Solache a Rice, 2019, Lebreton a kol., 2017, Neely a Maley, 2000, Santagati a kol., 2012). Druh *E. faecium* byl v roce 2008 zařazen do skupiny ESKAPE (akronym pro *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.) (Rice, 2008), která zahrnuje vysoce významné a rezistentní nozokomiální patogeny vyžadující pozornost současné klinické mikrobiologie (Mulani a kol., 2019, Pendleton a kol., 2013, Pogue a kol., 2015). Mimo výše uvedené infekce byly enterokoky izolovány z dlouhé řady dalších infekcí postihujících centrální nervový systém, nosní dutiny, vaginu, plíce, uši, oči, zubní kanálky nebo kosti (Higashide a kol., 2005, Jett a kol., 1994, Mylona a kol., 2012, Rishi a kol., 2009, Sandoe a kol., 2001, Savini a kol., 2008).

V procesu infekce se uplatňuje řada genů kódujících faktory virulence, které chrání enterokoky před imunitní reakcí organismu a umožňují navázání bakteriálních buněk na buňky hostitele a jejich průnik do tkáně. Mezi nejčastější a nejlépe popsány patří faktory kódované geny *agg* a *asa1* (aggregation substance), *cyl* (cytolysin), *hyl* (hyaluronidase), *gelE* (gelatinase), *esp* (extracellular surface protein), *ace* a *acm* (adhesion to collagen), *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilli) nebo *efaA* (adhesin-like endocarditis antigens) (Arias a Murray, 2012, Ben Braïek a Smaoui, 2019, García-Solache a Rice, 2019).

Z pohledu klinické praxe je významná především rezistence enterokoků k širokému spektru antibiotik. Enterokoky jsou přirozeně (primárně) rezistentní k sulfonamidům a k nízkým hladinám  $\beta$ -laktamů, aminoglykosidů a klindamycinu. K získaným (sekundárním) rezistencím pak patří například rezistence vůči chloramfenikolu, erytromycinu, fluorochinolonom, tetracyklinu, k vysokým hladinám klindamycinu, penicilinů, aminoglykosidů a glykopeptidů, a také k novějším antibiotikům jako je linezolid, daptomycin nebo quinupristin-dalfopristin (Ben Braïek a Smaoui, 2019, Leblanc, 2006, Švec a Franz, 2014a, Teixeira a kol., 2015). V popředí zájmu je především celosvětově narůstající rezistence enterokoků k vankomycinu, který byl dlouho dobu používán pro léčbu závažných infekcí nereagujících na jinou léčbu (Ben Braïek a Smaoui, 2019). Vankomycin rezistentní enterokoky tak v dnešní době představují terapeutický, epidemiologický i ekonomický problém (Contreras a kol., 2019, Puchter a kol., 2018).

Většinu klinicky relevantních kmenů, představující 80 až 90 %, tvoří zástupci druhu *E. faecalis* a dalších přibližně 5 až 10 % tvoří kmeny *E. faecium*. Zástupci dalších druhů, jako například *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. canintestini*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium* a *E. raffinosus*, jsou jako původci infekcí člověka izolováni vzácně (Aguirre a Collins, 1993, Ahmed a kol., 2011, Kaufhold a Ferrieri, 1991, Ruoff a kol., 1990, Schouten a kol., 2000, Tan a kol., 2010).

Přestože byly enterokoky izolovány z pestré škály infekcí různých živočichů, je ve srovnání s klinickým významem enterokoků pro člověka jejich výskyt ve veterinárním klinickém materiálu více sporadický a méně významný. Enterokoky byly popsány jako

původci septikémií, endokarditid a infekcí kloubů a kostí drůbeže (Chanter, 1997, Jung a kol., 2018, Petersen a kol., 2008, Petersen a kol., 2009), mastitid krav (Chanter, 1997, Nonnemann a kol., 2019) a ovcí (Marogna a kol., 2010), dále zánětů žlučových cest a žlučníku (Tamborini a kol., 2016), infekcí periodontu (Oliveira a kol., 2016) a zánětů kloubů psů (Soontornvipart a kol., 2003), infekcí močových cest psů a koček (Ball a kol., 2008, KuKanich a Lubbers, 2015, Merkel a kol., 2017), sepsí hříbat (Theelen a kol., 2014), povrchových hnisavých infekcí psů (Abbott a kol., 2009) a koní (Westgate a kol., 2011) a byly také izolovány z případů infekce žlučníku a jater kočky (Pressel a kol., 2005), průjmu selat (Vancanneyt a kol., 2001), infekce dolního dýchacího traktu koně (Bailey a Love, 1991, Balciunas a kol., 2013), fetální peritonitidy psa (de Assis a kol., 2017) nebo z infekcí ryb pakambaly velké a ze pstruhů (Nieto a kol., 1995, Ringo a Gatesoupe, 1998).

## 9. Praktický význam rodu *Enterococcus*

Průmyslový a ekonomický význam mají především kmeny enterokoků využívané jako probiotika a jako startovací kultury pro přípravu fermentovaných potravin. S ohledem na klinický význam enterokoků a jejich infekční potenciál, popsany v předchozí kapitole, se toto jejich využití může zdát kontroverzní. Řada studií dokladujících pozitivní vliv vybraných kmenů enterokoků na zdraví člověka a jejich dlouhodobé využívání bez popisu nepříznivých účinků ale ukazuje, že tyto mikroorganismy mohou být lidskému zdraví prospěšné. Pro průmyslové využití je však nezbytný výběr vhodných kmenů, které vykazují pozitivní vlastnosti a naopak nenesou vlastnosti rizikové z pohledu negativního působení na zdraví člověka (např. geny virulence a rezistence k antibiotikům) (Franz a kol., 1999, Franz a kol., 2011, Ogier a Serror, 2008). K nejlépe popsáným probiotickým kmenům patří *E. faecium* SF68 (Holzapfel a kol., 2018) a *E. faecalis* Symbioflor 1 (Domann a kol., 2007). Probiotické kmeny enterokoků jsou využívány pro zmírnění průběhu průjmů, včetně průjmů způsobených intenzivní antibiotickou terapií, dále pro zmírnění žaludečních potíží a infekcí dýchacího traktu, snížení hladiny cholesterolu a zlepšení imunity (Allen a kol., 2004, D'Souza a kol., 2002, Foulquie Moreno a kol., 2006, Franz a kol., 2011, Habermann a kol., 2002). Bylo také zjištěno, že brzdí proliferaci Caco-2 linie buněk kolorektálního karcinomu (Thirabunyanon a kol., 2009) a enterokoky jsou jako probiotika aplikovány také živočichům (Becquet, 2003, Franz a kol., 2011).

Kmeny enterokoků přítomné ve startovacích kulturách masných, mléčných i rostlinných fermentovaných produktů přispívají k procesu zrání a mají pozitivní vliv na celkové organoleptické vlastnosti potravin (Bhardwaj a kol., 2008, Franz a kol., 2002, Giraffa, 2003, Hugas a kol., 2003). K bezpečnosti potravin přispívá také široké spektrum bakteriocinů produkované enterokoky. Tyto bakteriociny, nazývané také enterociny, mohou být produkovány přímo kmeny enterokoků přítomnými v potravinách rostlinného i živočišného původu nebo mohou být do těchto produktů přidávány v purifikované formě (Hanchi a kol., 2018, Khan a kol., 2010). Jedná se o membránově aktivní peptidy, které vykazují antagonistickou aktivitu proti řadě gramnegativních, grampozitivních i sporulujících

patogenů asociovaných s potravinami, jako jsou například *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolytica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* nebo *Vibrio cholerae* (Egan a kol., 2016, Franz a Holzapfel, 2004, Franz a kol., 2007, Moll a kol., 1999, Nami a kol., 2019, Simonetta a kol., 1997).

## 10. Závěr

Úvodní kapitoly této taxonomicky zaměřené habilitační práce stručně shrnují historii a současnost klasifikace, nomenklatury a identifikace bakteriálního rodu *Enterococcus*. V návaznosti na taxonomii je diskutována ekologie zástupců tohoto rodu osídlující různá prostředí i živočichy a dále jejich pozitivní i negativní význam pro člověka. Obsahově byly tyto úvodní kapitoly koncipovány ve snaze seznámit čtenáře s aktuálními poznatky o rodu *Enterococcus* a stručně ukázat šíři současných znalostí o něm. Úvodní kapitoly ukazují, že tento bakteriální rod lze charakterizovat jako taxonomicky bohatou bakteriální skupinu osídlující půdy, vody a vodní prostředí, rostliny, živočichy i člověka. Jedná se o mikroorganismy rezistentní k řadě chemických i fyzikálních faktorů vnějšího prostředí, což jim umožňuje zde přežít a dále se šířit. Ačkoliv je infekční potenciál enterokoků poměrně nízký, představují, díky své rezistenci a svému téměř ubikvitnímu rozšíření, důležité oportunní patogeny asociované s řadou infekcí, včetně infekcí nozokomiálních. Zanedbatelný však není ani jejich pozitivní význam daný kladným vlivem probiotických kmenů enterokoků na zdraví člověka i živočichů a jejich významem v potravinářském průmyslu. Z pohledu člověka jsou tak enterokoky organismy "s dvojí tváří", jejichž praktické využití vyžaduje pečlivý výběr kmenů, které nepředstavují potenciální riziko pro lidské zdraví.

Výzkum na poli taxonomie enterokoků není uzavřenou kapitolou. Důkazem toho jsou jak popisy 12 druhů enterokoků uvedené v rámci vybraných komentovaných publikací autora, které jsou prezentované v následujících kapitolách, tak například recentní publikace popisující pět nových druhů enterokoků (Li a Gu, v tisku). Také rutinní zavádění a využívání molekulárně-genetických metod, které poskytují spolehlivější a rychlejší taxonomickou identifikaci, zpřesňuje a rozšiřuje naše poznatky o rozšíření a výskytu jednotlivých druhů enterokoků v různých prostředích a o jejich možné ekologické roli zde. Prakticky slibný a rozvíjející se směr studia enterokoků představuje do budoucna výzkum bakteriocinů produkovaných enterokoky aktivních proti řadě patogenů, které mohou v dnešní době masivního nárůstu antibiotické rezistence představovat jednu z možných alternativ pro léčbu bakteriálních infekcí. Budoucí směry výzkumu i podobu směřování bakteriální systematiky je v dnešní době dynamických změn v taxonomii bakterií těžké předjímat. Vysoký počet každoročně publikovaných vědeckých prací zabývajících se rodem *Enterococcus* však ukazuje setrvalý zájem o tyto mikroorganismy. Je tedy možné předpokládat, že tento trend bude především s ohledem na klinický význam enterokoků pokračovat i v následujících letech a že jejich výzkum přinese řadu poznatků rozšiřujících naše teoretické znalosti i řadu nových informací využitelných pro člověka.

## 11. Komentované publikace autora

V následující části této habilitační práce je prezentováno 18 vybraných komentovaných publikací autora zabývajících se taxonomií či identifikací zástupců rodu *Enterococcus*. Z důvodu akademické korektnosti i pravidel publikační etiky je zde potřeba uvést, že první tři publikace byly již komentovány v rámci disertační práce autora, která byla obhájena v roce 2001 a třetí publikace (**Švec a kol., 2001b**) byla součástí rigorózní práce autora obhájené v roce 2005, která byla zaměřena metodicky a zabývala se využitím metody ribotypizace v taxonomii různých skupin bakterií. V souboru komentovaných publikací jsou tyto práce přesto uvedeny, protože obsahově i koncepčně korespondují s tématem této habilitační práce, zapadají do celkového obrazu přínosu autora pro taxonomii bakteriálního rodu *Enterococcus* a především první z nich (Švec a Sedláček, 1999) tvoří výchozí bod i pro některé další později publikované studie. Komentář k publikacím není koncipován jako striktně odborný text popisující vyčerpávajícím způsobem výčet metod, výsledků a závěrů jednotlivých prací. Snahou autora v této části práce je cíl práce, použité metody i výsledky jen stručně sumarizovat, začlenit každou publikaci v kontextu doby jejího vzniku a tehdy aktuálních znalostí a ukázat její případnou vazbu na další publikace autora a přínos pro celkové znalosti v oboru.

Jednotlivé práce, které byly publikovány v letech 1999 až 2017, jsou uspořádány a komentovány v chronologickém pořadí:

1. **Švec, P.**, Sedláček, I. (1999). Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol* 44, 3-10.
2. **Švec, P.**, Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., new species isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1567-1574.
3. **Švec, P.**, Sedláček, I., Pantůček, R., Devriese, L., Doškař, J. (2001). Evaluation of ribotyping for characterization and identification of *Enterococcus haemoperoxidus* and *Enterococcus moraviensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 203, 23-27.
4. **Švec, P.**, Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2002). Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*. *J Appl Microbiol* 92, 951-957.
5. **Švec, P.**, Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 247, 59-63.
6. Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., **Švec, P.**, Decostere, A., Haesebrouck, F., Swings, J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2177-2182.

7. **Švec, P.**, Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2183-2187.
8. **Švec, P.**, Vancanneyt, M., Koort, J., Naser, S., Hoste, B., Vihavainen, E., Vandamme, P., Swings, J., Björkroth, J. (2005). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2479-2484.
9. **Švec, P.**, Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 577-581.
10. Lauková, A., **Švec, P.**, Strompfová, V., Štětina, V., Sedláček, I. (2007). Properties of the strains *Enterococcus haemoperoxidus* and *E. moraviensis*, new species among enterococci. *Folia Microbiol* 52, 273-279.
11. **Švec, P.**, Vandamme, P., Bryndová, H., Holochová, P., Kosina, M., Mašlaňová, I., Sedláček, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1499-1505.
12. Frolková, P., Ghosh, A., **Švec, P.**, Zurek, L., Literák, I. (2012). Use of the manganese-dependent superoxide dismutase gene *sodA* for rapid identification of recently described enterococcal species. *Folia Microbiol* 57, 439-442.
13. Niemi, R.M., Ollinkangas, T., Paulin, L., **Švec, P.**, Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M., Lindström, K. (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2169-2173.
14. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlaňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., **Švec P.** (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two novel urease-producing enterococci from the environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 502-510.
15. Frolková, P., **Švec, P.**, Sedláček, I., Mašlaňová, I., Černošlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměšský, T., Literák, I. (2013). *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3069-3074.
16. Beneš J., Džupová, O., Štětina, M., Feuereisl, R., **Švec, P.**, Pantůček, R. (2013). Relapsing endocarditis caused by *Enterococcus faecalis* forming small colony variants. *Scand J Inf Dis* 45, 800-803.
17. Šplíchalová, P., **Švec, P.**, Ghosh, A., Zurek, L., Oravcová, V., Radiměšský, T., Bohuš, M., Literák, I. (2015). Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. *Anton Leeuw Int J G* 107, 1281-1289.
18. Oravcová, V., **Švec, P.**, Literák, I. (2017). Vancomycin-resistant enterococci with *vanA* and *vanB* genes in Australian gulls. *Environ Microbiol Reports* 9, 316-318.

11.1. Švec, P., Sedláček, I. (1999). Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol* 44, 3-10.

*Autorský podíl uchazeče: 70 %*

Přítomnost bakterií rodu *Enterococcus* ve vodách je považována za jeden z ukazatelů fekálního znečištění. Stanovení jejich množství je proto běžnou analýzou v laboratořích testujících kvalitu vody. Rutinně však taková analýza stanovuje pouze počet kolonie tvořících jednotek suspektních enterokoků na specifickém selektivním kultivačním médiu, což nemusí z důvodu nedostatečné selektivity média vždy poskytovat spolehlivé výsledky a z pohledu taxonomického neříkají tyto výsledky nic o druhové diverzitě ve vzorku. V této práci jsme se proto zaměřili na studium kmenů enterokoků izolovaných ze vzorků z rutinních rozborů povrchových vod, které byly poskytnuty Dr. Boleslavem Otipkou z Okresní hygienické stanice v Dobré u Frýdku-Místku.

Výchozím materiálem této studie byly suspektní kolonie enterokoků vykultivované na Slanetz-Bartley agaru, kde byly kultivovány bakteriologické filtry po filtraci 10 ml vzorků analyzovaných vod. Z každého vzorku byly izolovány a purifikovány jednotlivé morfologicky odlišné kolonie suspektních enterokoků, které na tomto agaru tvoří červené až tmavě fialové zbarvení. Celkem tak bylo izolováno 630 bakteriálních kmenů získaných ze 422 vzorků vod. Izolované kmeny byly charakterizovány pomocí konvenčních i komerčních biochemických a fyziologických testů relevantních pro rod *Enterococcus* a byly vyhodnoceny pomocí identifikačního programu TNW a identifikačních schémat popsanych v literatuře.

Z celkového množství 630 kmenů bylo tímto přístupem zařazeno do rodu *Enterococcus* 523 kmenů, které byly identifikovány jako *E. faecium* (135 kmenů), *E. faecalis* (115), *E. mundtii* (30), *E. hirae* (27), *E. casseliflavus* (22), *E. gallinarum* (21), *E. durans*/*E. hirae* (17), *E. durans* (5) a *E. avium* (1). Celkem 150 kmenů nebylo možno zařadit do žádného známého druhu a bylo zařazeno pouze na úroveň rodu jako *Enterococcus* sp. Výsledky fenotypizace zbývajících 107 kmenů vyizolovaných na Slanetz-Bartley médiu neodpovídaly základním charakteristikám rodu *Enterococcus*. Tyto kmeny byly zástupci jiných bakteriálních skupin (gramnegativní a grampozitivní tyčky i jiné grampozitivní koky).

Z pohledu dnešní situace v taxonomii rodu *Enterococcus* je tato práce do značné míry již zastaralá a výsledky biochemické identifikace některých z analyzovaných kmenů velmi pravděpodobně neodpovídají aktuální klasifikaci. Toto konstatování se však týká prakticky všech starších taxonomických studií, a to nejen těch založených na fenotypové identifikaci, a odráží velmi dynamický rozvoj taxonomie bakterií v posledních desetiletích. Obecné závěry této práce jsou však stále validní. Tato studie ukázala vysokou fenotypovou diverzitu enterokoků ve vodách a naznačila existenci nových nepopsaných druhů. Tyto závěry byly potvrzeny v našich navazujících popisech nových druhů enterokoků (**Sedláček a kol., 2013, Švec a kol., 2001a, Švec a kol., 2006**), v rámci kterých byly podrobně taxonomicky studovány právě kmeny izolované v této prvotní komentované práci, a také v dalších popisech nových druhů z dalších zdrojů vod (**Niemi a kol., 2012, Sístek a kol., 2012**).

11.2. Švec, P., Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., new species isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1567-1574.

*Autorský podíl uchazeče: 40 %*

V pořadí druhá publikace navazuje na předchozí práci a popisuje polyfázovou taxonomickou studii dvou vybraných skupin kmenů enterokoků, které byly izolované ze vzorků pitné a užitkové vody, z vodních toků a z bazénů v regionu Severomoravského kraje. Tyto dvě skupiny (16 a 7 kmenů) byly vyčleněny na základě shodných biochemických charakteristik, avšak fenotypizací je nebylo možné identifikovat do žádného v té době popsaného druhu rodu *Enterococcus*.

Pro primární genotypovou charakteristiku analyzovaných skupin byla využita metoda tDNA-PCR (tRNA intergenic length polymorphism analysis) (Baele a kol., 2000), která ukázala genetickou homogenitu kmenů v rámci těchto skupin a současně obě skupiny odlišila od sebe i od zbývajících druhů enterokoků. Fylogenetická analýza provedená na základě genu pro 16S rRNA ukázala blízkou fylogenetickou příbuznost obou studovaných skupin (99,7 %) a jejich nejbližším příbuzným druhem byl *E. faecalis* (97,4 %). Dále bylo stanoveno procento G+C v DNA a všechny kmeny byly charakterizovány rozšířenou řadou fyziologických a biochemických komerčních a konvenčních testů. Protože byly podobnosti sekvencí genu pro 16S rRNA vyšší než 97 %, což je hodnota která byla v té době akceptována jako hranice pro spolehlivé odlišení druhů, byla provedena DNA-DNA hybridizace mezi dvěma zástupci z každé skupiny a typovým kmenem *E. faecalis* LMG 7937<sup>T</sup>, která v souladu s předchozími výsledky potvrdila homogenitu obou skupin a jejich odlišení od druhu *E. faecalis*. Na základě těchto výsledků byly proto navrženy dva nové druhy *E. haemoperoxidus* a *E. moraviensis*.

Jak naše, tak zahraniční studie z pozdějších let, však ukázaly, že *E. haemoperoxidus* i *E. moraviensis* je možné izolovat také z jiných zdrojů. Oba tyto druhy jsme později v rámci diplomové práce řešené na našem pracovišti izolovali z rostlin (Bryndová, 2010). Skupina holandských autorů (Taučer-Kapteijn a kol., 2016, Taučer-Kapteijn a kol., 2017) zachytila oba druhy ve vzorcích vod z přírodní čističky odpadní vody a v rámci hledání možných fekálních zdrojů těchto kmenů izolovala *E. moraviensis* i *E. haemoperoxidus* z výkalů husy velké (*Anser anser*), a druh *E. moraviensis* navíc z výkalů lišky obecné (*Vulpes vulpes*) a králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*). Oba druhy byly detekovány také jako součást mikroflóry dvoukřídlého hmyzu rodu *Bactrocera* (čeleď Vrtulovití). *Enterococcus moraviensis* byl zachycen v zástupcích druhu *Bactrocera carambolae* (Yong a kol., 2019), zatímco *E. haemoperoxidus* v *Bactrocera dorsalis* (Andongma a kol., 2015). Tyto výsledky ukazují, že oba druhy popsané v naší práci ze vzorků vod nejsou vázány jen na vodní habitat a s ohledem na jejich dosavadní záchyt z několika různých živočichů lze očekávat, že budou nalezeny také jako součást mikroflóry dalších živočišných druhů.

11.3. Švec, P., Sedláček, I., Pantůček, R., Devriese, L., Doškař, J. (2001). Evaluation of ribotyping for characterization and identification of *Enterococcus haemoperoxidus* and *Enterococcus moraviensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 203, 23-27.

*Autorský podíl uchazeče: 70 %*

Taxonomie bakterií není jen charakterizace a uspořádávání nových taxonů a jejich pojmenování, tedy klasifikace a nomenklatura. Nedílnou součástí taxonomie je také její praktické využití formou identifikace. V této studii jsme se zaměřili na využití metody manuální ribotypizace pro typizaci a identifikaci druhů *E. haemoperoxidus* a *E. moraviensis*. Metoda ribotypizace byla popsána v roce 1986 (Grimont a Grimont, 1986) a je založená na selektivní hybridizaci a následné detekci restričních fragmentů nesoucích geny kódující ribozomální RNA. Díky využití sondy komplementární k genům pro ribozomální RNA je tato metoda teoreticky univerzální, protože se jedná o geny přítomné ve všech bakteriích. Kmenová či druhová diskriminativnost ribotypizace pro konkrétní taxon je ovlivněna použitým restričním enzymem i sekvencí použité DNA sondy, která může být komplementární jen k 16S rRNA, k 16S i 23S rRNA, nebo k celému ribozomálnímu operonu. Jedná se o metodu pracnou a časově náročnou. Tyto nevýhody byly do jisté míry překonány automatickým systémem RiboPrinter (DuPont Qualicon), který je v dnešní době využíván jak pro rutinní identifikaci a typizaci mikroorganismů, tak pro taxonomické studie a popisy nových bakteriálních druhů (Dalsgaard a kol., 1999, Schumann a Pukall, 2013).

V naší práci jsme metodou manuální ribotypizace charakterizovali 16 kmenů druhu *E. haemoperoxidus* a 7 kmenů *E. moraviensis* a srovnali jsme je s ribotypy typových a referenčních kultur dalších druhů rodu *Enterococcus*. Metoda ribotypizace byla provedena se dvěma restričními enzymy *EcoRI* a *HindIII* a jako sonda byla použita digoxigeninem značená DNA komplementární k 16S a 23S rRNA bakterie *Escherichia coli*.

Numerická analýza výsledných *EcoRI* a *HindIII* ribotypů kmenů *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* a zástupců dalších druhů enterokoků separovala jednotlivé druhy do jasně oddělených shluků, což ukázalo využitelnost ribotypizace pro identifikaci obou nových druhů. Enzymem *HindIII* bylo mezi kmeny *E. haemoperoxidus* detekováno 5 ribotypů a mezi kmeny *E. moraviensis* 2 ribotypy, zatímco enzymem *EcoRI* byly kmeny *E. haemoperoxidus* rozděleny do 6 ribotypů a kmeny *E. moraviensis* do 4 ribotypů. Výsledek práce tak ukázal, že tyto metody mohou být do jisté míry použitelné také pro kmenovou typizaci obou druhů, ačkoliv pro jejich spolehlivé odlišení pro epidemiologické studie by bylo potřeba paralelně využít typizaci pomocí více enzymů nebo zkombinovat výsledek ribotypizace s jinými typizačními technikami.

V devadesátých letech minulého století byla manuální ribotypizace technikou využívanou jak pro typizaci, tak pro identifikaci bakterií, ale v dnešních taxonomických publikacích se s ní již téměř nesetkáváme. Z důvodu pracnosti a časové náročnosti byla tato metoda nahrazena jinými molekulárně-biologickými typizačními a identifikačními technikami, případně je prováděna výše zmíněným systémem RiboPrinter.



11.4. Švec, P., Devriese, L., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Doškař, J. (2002). Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*. *J Appl Microbiol* 92, 951-957.

*Autorský podíl uchazeče: 60 %*

Tato práce popisuje taxonomickou studii skupiny 12 kmenů, které byly na základě rodově specifických charakteristik, pozitivního testu na pohyblivost a produkce žlutého pigmentu identifikovány jako suspektní *Enterococcus casseliflavus*. Testy okyselování několika cukrů však neodpovídaly typickým charakteristikám druhu *E. casseliflavus*, takže nebylo možno vyloučit, že se nejedná o zástupce druhu nového. Studovaná skupina kmenů byla izolována ze střevního traktu hlemýžďů *Helix aspersa* pocházejících z komerčního chovu a byla našemu pracovišti poskytnuta Prof. MVDr. Jiřím Smolou, CSc. z Ústavu mikrobiologie a imunologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.

Studované kmeny byly charakterizovány pomocí základních testů relevantních pro rod *Enterococcus* (morfologie buněk a kolonií, produkce pigmentu, pohyblivost, růst při 10 a 45°C, v 6,5% NaCl, produkce D antigenu) a dále pomocí komerčních souprav API 20 STREP a API 50 CH (bioMérieux). Na základě těchto testů byly všechny kmeny zařazeny do druhu *E. casseliflavus*, ale vykazovaly atypické reakce pro okyselování melezitózy, amidonu a D-tagatózy. Výsledné elektroforetické profily typizace těchto kmenů metodou tDNA-PCR (tRNA intergenic length polymorphism analysis) byly velmi podobné profilům *E. casseliflavus*, ale v rámci shlukové analýzy tvořily samostatný shluk, který byl diferencován na dvě podskupiny, a který byl od *E. casseliflavus* odlišen. Pro další analýzu byly proto vybrány dva kmeny (z každé tDNA-PCR podskupiny jeden), které byly charakterizovány sekvenací genu pro 16S RNA a metodou DNA-DNA hybridizace byly srovnány s typovými kulturami *E. casseliflavus* a druhu *E. gallinarum*, který představoval druhý fylogeneticky příbuzný pohyblivý druh enterokoka. Výsledky obou těchto metod prokázaly, že studovaná skupina nepředstavuje nový druh, ale že se skutečně jedná o fenotypově atypické zástupce *E. casseliflavus*.

Druh *E. casseliflavus* byl popsán již v roce 1984 (Collins a kol., 1984) a z pohledu dnešní taxonomie představuje typický druh enterokoka, který odpovídá všem klasickým rodově specifickým fenotypovým charakteristikám. Tento druh je běžně izolován z vody, půdy, rostlin i živočichů, takže jeho výskyt ve střevech hlemýžďů není překvapivý a byl popsán také jinými autory (Charrier a kol., 1998, Charrier a kol., 2006). Možné atypické výsledky některých biochemických testů kmenů z hlemýžďů také nejsou v rozporu se současnými poznatky. Odlišnost environmentálních kmenů od kmenů z humánního klinického materiálu, které jsou v literatuře nejčastěji charakterizovány, byla již v literatuře popsána (Devriese a kol., 1993, Niemi a kol., 1993, Ulrich a Müller, 1998). Studovaná skupina kmenů izolovaná ze střeva hlemýžďů tedy pravděpodobně představuje fenotypově specifický ekovar druhu *E. casseliflavus*.

11.5. Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J. (2005). Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 247, 59-63.

*Autorský podíl uchazeče: 70 %*

Metody rep-PCR (repetitive element sequence-based PCR) jsou založeny na srovnání elektroforetických profilů produktů PCR s primery komplementárními k rozptýleným repetitivním sekvencím (interspersed repetitive sequences) (Lupski a Weinstock, 1992). Jedná se o nekódující sekvence, které jsou v genomech prokaryot rozptýleny v různém množství, orientaci a poloze a představují tak vhodný cíl pro typizační a identifikační techniky (Versalovic a Lupski, 1999). Diskriminativní síla těchto metod je variabilní a závisí na studovaném taxonu i použitém primeru. Tyto metody jsou rychlé, málo pracné, nenáročné na technické vybavení a levné. Nevýhodou je však problematická standardizace a mezilaboratorní reprodukovatelnost. Přesto jsou tyto metody v taxonomických studiích využívány jak pro typizaci, tak pro identifikaci různých bakteriálních skupin. Stejně jako v případě výše diskutované ribotypizace, je i pro metody rep-PCR dostupný komerční automatický systém DiversiLab (BioMérieux) (Healy a kol., 2005).

V této naší metodicky orientované práci jsme se zaměřili na použitelnost metody rep-PCR pro identifikaci druhů rodu *Enterococcus*. V prvním kroku bylo s primery REP, ERIC, BOX a (GTG)<sub>5</sub> charakterizováno 24 typových a referenčních kmenů enterokoků. Na základě výsledků byl pro další testování vybrán primer (GTG)<sub>5</sub>, který poskytoval nejvíce komplexní a diskriminativní profily PCR produktů. S tímto primerem byla následně vytvořena knihovna profilů 49 typových a referenčních kmenů enterokoků, které reprezentovaly všechny v té době validně popsané druhy. Dále byla analyzována skupina 112 kmenů již fenotypově a genotypově identifikovaných enterokoků izolovaných z bryndzy a poslední skupinou začleněnou do studie bylo 44 neidentifikovaných kmenů enterokoků z vod. Shluková analýza získaných výsledků jednoznačně separovala jednotlivé druhy do dobře odlišených shluků. Pouze kmeny druhu *E. faecium* byly odděleny do dvou shluků, což korespondovalo s dříve publikovanými výsledky (Vancanneyt a kol., 2002). Výsledek této práce tak ukázal, že metoda rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> je vhodná pro rychlou identifikaci druhů enterokoků.

Závěry této práce, zavedení a standardizaci metody na našem pracovišti a vytvoření databáze rep-PCR profilů referenčních kmenů bylo pro identifikaci nebo pro rychlé genotypové testování neznámých skupin kmenů využito v řadě navazujících studií týkajících se rodu *Enterococcus* (Beneš a kol., 2013, Frolková a kol., 2013, Niemi a kol., 2012, Sedláček a kol., 2013, Šplíchalová a kol., 2015, Švec a kol., 2005a, Švec a kol., 2005b, Švec a kol., 2006, Švec a kol., 2012) i v dalších studiích jiných rodů a druhů bakterií (např. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pedobacter*), které jsou však obsahově mimo rámec této habilitační práce (Švec a Sedláček, 2008, Švec a kol., 2008, Švec a kol., 2009, Švec a kol., 2010, Švec a kol., 2011, Švec a kol., 2015, Švec a kol., 2016, Švec a kol., 2017).

11.6. Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Švec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., Swings, J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2177-2182.

*Autorský podíl uchazeče: 8 %*

Dalším nově popsaným druhem je *E. canintestini*, který byl izolován v rámci studia mikrofóry trávicího traktu psů. V této práci bylo taxonomicky charakterizováno 13 bakteriálních kmenů, které byly biochemicky podobné druhu *E. dispar*, ale vykazovaly několik atypických fenotypových výsledků (produkce  $\alpha$ -galaktosidázy,  $\beta$ -galaktosidázy, pyrrolidonylarylamidázy a leucinaminopeptidázy, okyselování glycerolu, D-melibiózy a rafinózy a hydrolýza pyruvátu). Všechny kmeny byly charakterizovány metodou multilokusové sekvenční analýzy zahrnující geny *atpA* (kódující alfa podjednotku ATP syntázy), *rpoA* (kódující alfa podjednotku RNA polymerázy) a *pheS* (kódující alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy). Fylogenetická analýza všech těchto genů ukázala, že studovaná skupina kmenů tvoří jeden taxon, který je jasně odlišený od známých druhů enterokoků. Analýza genu pro 16S rRNA ukázala jako nejbližší fylogeneticky příbuzné druhy *E. dispar*, *E. canis* a *E. asini*. Také další analýzy pomocí tDNA-PCR (tRNA intergenic length polymorphism analysis) a srovnání celkových buněčných proteinů metodou SDS-PAGE prokázaly homogenitu souboru všech 13 studovaných kmenů a jejich odlišení od již známých druhů enterokoků, které bylo potvrzeno metodou DNA-DNA hybridizace. Pro tento nový druh bylo s ohledem na zdroj izolace studovaných kmenů navrženo jméno *E. canintestini*.

Přítomnost různých druhů enterokoků v trávicím traktu psů byla popsána v řadě publikací (Damborg a kol., 2009, De Graef a kol., 2003, Devriese a kol., 1992a, Kubašová a kol., 2017) a *E. canintestini* tak představuje další z validovaných druhů osídlujících tento habitat. Z faeces psů byl izolován a podrobně popsán kmen *E. canintestini* 49 produkující řadu bakteriocinů aktivních proti *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* a vancomycin rezistentním enterokokům. V genomu tohoto kmene, který má velikost 2 734 830 bazí, bylo nalezeno šest genů pro bakteriociny, ale žádné geny pro virulentní faktory, takže tento kmen je potenciálně využitelný jako probiotikum (Acedo a kol., 2017). Hutchins a kol. (2013) popsali *E. canintestini* jako běžnou součást vaginální mikroflóry vykastrovaných fen, což prokazuje, že výskyt tohoto druhu u psů není omezen jen na trávicí trakt. *Enterococcus canintestini* byl však již popsán také z dalších klinických materiálů. Dva kmeny *E. canintestini* byly izolovány z bovinních mastitid (Werner a kol., 2012) a jeden kmen byl izolován na Taiwanu jako původce nozokomiální bakteriémie onkologické pacientky (Tan a kol., 2010), což ukazuje na oportunně patogenní potenciál tohoto druhu.

11.7. Švec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2183-2187.

*Autorský podíl uchazeče: 65 %*

Popis druhu *E. aquimarinus* vychází z polyfázové taxonomické studie dvou kmenů, které byly uloženy v BCCM/LMG sbírce mikroorganismů pod čísly LMG 16607<sup>T</sup> a LMG 16612. Analýza jejich profilů celkových buněčných proteinů ukázala, že oba tyto kmeny jsou zástupci totožného taxonu, ale jejich profily byly shlukovou analýzou odděleny od zbývajících referenčních a typových zástupců rodu *Enterococcus*. Tyto kmeny byly v BCCM/LMG sbírce mikroorganismů uloženy firmou bioMérieux, která je získala od Istituto Superiore di Sanita of Roma (Itálie) a oba byly izolovány z mořské vody.

Fylogenetická analýza genu pro 16S rRNA odlišila kmen LMG 16607<sup>T</sup> od sekvencí typových kmenů zbývajících validních druhů a ukázala, že tento kmen tvoří v rámci rodu *Enterococcus* samostatnou fylogenetickou větev. Nejbližším příbuzným druhem byl *E. saccharolyticus*, který vykazoval 96,9% podobnost tohoto genu. Dále byly oba analyzované kmeny charakterizovány fenotypově řadou konvenčních a komerčních testů, stanovením sekvence genu pro *pheS* (kódující alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) a metodou rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>. Všechny tyto výsledky ukázaly jejich odlišení od popsáných druhů enterokoků a potvrdily, že oba kmeny pocházející z mořské vody představují zástupce nového druhu, pro který bylo navrženo jméno *E. aquimarinus*.

Od popisu *E. aquimarinus* v roce 2005 bohužel zatím v literatuře mnoho zmínek o výskytu tohoto druhu není. Chen a kol. (2012) identifikovali *E. aquimarinus* jako běžnou bakterii ve vzorcích z plžů *Batillaria zonalis* na Taiwanu a dva kmeny byly zachyceny z blíže nespecifikovaných vzorků z hus v Polsku (Dolka a kol., 2017). Další práce popisující analýzu sekvencí genů pro 16S rRNA získaných ze vzorků syrové nafty ukázala, že převládající sekvence v těchto vzorcích byla nejbližší druhu *E. aquimarinus* (Albokari a kol., 2015). Jejich podobnost k typové kultuře LMG 16607<sup>T</sup> však byla jen 97,4 % což je s ohledem na celkově vysoké podobnosti sekvencí genů pro 16S rRNA mezi druhy enterokoků velmi nízká hodnota a s vysokou pravděpodobností se tak o sekvence zástupců druhu *E. aquimarinus* nejedná.

11.8. Švec, P., Vancanneyt, M., Koort, J., Naser, S., Hoste, B., Vihavainen, E., Vandamme, P., Swings, J., Björkroth, J. (2005). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2479-2484.

*Autorský podíl uchazeče: 60 %*

Tato publikace popisuje taxonomickou studii čtyř kmenů enterokoků izolovaných z živočišných zdrojů. Dva kmeny byly uloženy v BCCM/LMG sbírce mikroorganismů v letech 1993 (kmen LMG 13603) a 1994 (kmen LMG 14595<sup>T</sup>). Oba byly izolovány Dr. L. A. Devriesem (Belgie) ze skotu a pomocí fenotypizace identifikovány jako druh *E. raffinosus*. Další dva kmeny byly izolovány ve Finsku (Department of Food and Environmental Hygiene, University of Helsinki). Kmen LMG 22830 byl izolován ze vzduchu továrny na zpracování drůbežích produktů a kmen LMG 22829 ze vzorku vakuově balené grilované mihule říční. Kmeny LMG 13603 a LMG 14595<sup>T</sup> byly primárně odlišeny od druhu *E. raffinosus* i od zbývajících druhů enterokoků pomocí sekvenční analýzy genu *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) v rámci přípravy databáze pro evaluaci této metody pro identifikaci enterokoků (Naser a kol., 2007). Kmeny LMG 22830 a LMG 22829 byly primárně charakterizovány ribotypizací a touto metodou byly jasně odlišeny od typové kultury *E. raffinosus*, ale jejich výsledné ribotypy byly velmi podobné právě kmenům LMG 13603 a LMG 14595<sup>T</sup>.

Vybraná skupina kmenů byla dále charakterizována stanovením sekvence genu pro 16S rRNA, který ji zařadil v rámci fylogenetické skupiny *E. avium* s nejbližšími příbuznými druhy *E. pseudoavium* a *E. raffinosus*. Další studium pomocí analýzy celkových buněčných proteinů metodou SDS-PAGE a s využitím metody rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> potvrdily homogenitu studované skupiny i její separaci od zbývajících druhů. Stejně jako v předchozích popisech, kdy byla podobnost 16S rRNA sekvencí studované skupiny a fylogeneticky příbuzných druhů vyšší než 97 %, byly výsledky potvrzeny metodou DNA-DNA hybridizace. Tento druh byl na počest belgického mikrobiologa Dr. L. A. Devrieseho pojmenován *E. devriesei* za jeho přínos pro taxonomii enterokoků.

Izolace enterokoků z živočichů a živočišných produktů a potravin byla dokumentována řadou publikací a obecně lze shrnout, že jsou tyto habitaty osídleny pestrou škálou různých druhů rodu *Enterococcus* (viz kapitola 7.4). Popis nových druhů z těchto zdrojů lze proto velmi pravděpodobně očekávat i v budoucnu. *Enterococcus devriesei* byl od svého popisu v roce 2005 již izolován z několika dalších zdrojů svázaných s živočichy. Kmeny tohoto druhu byly izolovány z provozu porážky skotu v Keni (Wambui a kol., 2018), z hovězího a vepřového masa (Golob a kol., 2019), z výroby vepřových fermentovaných salámů Fuet (Martín a kol., 2009) i trvanlivých salámů z hovězího masa (Gaglio a kol., 2016). Byl také izolován z mléčných výrobků, které zahrnují francouzský měkký sýr Maroilles (Nacef a kol., 2017) a španělské sýry z ovčího (Ordiales a kol., 2013) a kozího (Martín-Platero a kol., 2009) mléka nebo z jejich směsi (Abriouel a kol., 2008).

11.9. Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 577-581.

*Autorský podíl uchazeče: 65 %*

Popis nových druhů *E. silesiacus* a *E. termitis* byl založen na taxonomické studii tří kmenů. Druh *E. silesiacus* představovaly dva kmeny, které byly izolovány z pitné vody v rámci naší studie enterokoků z vod popsáné v první práci tohoto souboru komentovaných publikací (Švec a Sedláček, 1999). Kmen druhu *E. termitis* byl v BCCM/LMG sbírce mikroorganismů původně uložen jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 8895, jeho profil celkových buněčných proteinů však neodpovídal zařazení do uvedeného poddruhu.

Metodický přístup této práce je obdobný, jako je tomu v našich předchozích popisných pracích. Kmeny byly charakterizovány metodou rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>, která je odlišila od zbývajících enterokoků a současně ukázala vysokou podobnost obou kmenů z vod. Následná analýza sekvence genu pro 16S rRNA je zařadila do rodu *Enterococcus*, kde fylogeneticky nejbližší byly druhy *E. haemoperoxidus* a *E. moraviensis* z fylogenetické skupiny *E. faecalis*. Sekvenční analýza genu *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy), analýza celkových buněčných proteinů i fenotypizace také ukázaly, že tři studované kmeny reprezentují dva nové druhy enterokoků, což bylo finálně potvrzeno metodou DNA-DNA hybridizace. Navržené druhové jméno *termitis* odráží zdroj izolace kmene LMG 8895<sup>T</sup>, který byl izolován ze střeva termita a jméno *silesiacus* bylo navrženo podle Slezska, tedy lokality odběru vzorků vod, ze kterých byly kmeny *E. silesiacus* izolovány.

Stejně jako v případě druhu *E. aquimarinus* byl záchyt těchto dvou druhů doposud popsán jen v několika publikacích. Jeden kmen *E. silesiacus* byl izolován ze střeva škůdce bavlníku kříška *Amrasca biguttula biguttula* (čeleď *Cicadellidae*). Tento kmen byl však identifikován jen na základě 99% podobnosti genu 16S rRNA se sekvencí typové kultury (Sivakumar a kol., 2016, Sivakumar a kol., 2017). Podobně byl druh *E. silesiacus* pouze na základě sekvence genu pro 16S rRNA identifikován z komára *Culex quinquefasciatus* (Chandel a kol., 2013), z nespécifikovaného environmentálního zdroje v USA (Danvers, Massachusetts) (Lyons a kol., 2015), ze vzorků ze samic komárů *Culiseta melanura* a *Coquillettidia perturbans* (Andrews a kol., 2014) a 13 kmenů bylo pomocí sekvence genu pro 16S rRNA identifikováno z delfínů skákavých (*Tursiops truncatus*) (Diaz a kol., 2013). Druh *E. termitis* byl na základě metagenomických analýz nalezen jako součást mikroflóry trávicího traktu larev škůdců rostlin blýskavky (*Spodoptera littoralis*) a černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*) z řádu *Lepidoptera* (Tang a kol., 2012) a byl nalezen jako jeden z převládajících mikroorganismů ve střevě octomilek (*Drosophila*) (Adair a kol., 2018, Wong a kol., 2013). S ohledem na velmi vysokou podobnost sekvencí genu pro 16S rRNA mezi příbuznými druhy enterokoků (viz. kapitola 6) je však z taxonomického pohledu potřeba hodnotit tyto výsledky identifikace jako nejisté. Minimálně však naznačují, že zástupci fylogenetické skupiny *E. faecalis* jsou běžnou součástí trávicího traktu hmyzu.

11.10. Lauková, A., Švec, P., Strompfová, V., Štětina, V., Sedláček, I. (2007). Properties of the strains *Enterococcus haemoperoxidus* and *E. moraviensis*, new species among enterococci. *Folia Microbiol* 52, 273-279.

*Autorský podíl uchazeče: 15 %*

Validní taxonomický popis nového mikroorganismu přináší jen základní informace a tím, že definuje jeho základní vlastnosti, umožňuje jeho identifikaci. Je to však jen první krok na cestě k poznání organismu. V této krátké práci jsme se zaměřili na studium antibiotické rezistence a produkce ureázy a bakteriocinů 16 kmeny *E. haemoperoxidus* a 7 kmeny *E. moraviensis* popsány v naší druhé komentované publikaci (Švec a kol., 2001a), a také na studium citlivosti těchto kmenů k bakteriocinům produkovaným jinými bakteriemi. Tyto charakteristiky jsou důležité pro ekologii, klinický význam i praktické využití pro člověka. Bakteriální ureázy hydrolyzují močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Produkce tohoto enzymu je významná z pohledu klinické mikrobiologie (např. rozvoj močových kamenů, žaludečních vředů nebo infekce ledvin) nebo může mít pozitivní efekt, jako je tomu u střevních mikroorganismů, které se podílejí na recyklaci dusíku z močoviny (např. v batoru přežvýkavců) nebo u ureáz produkovaných půdními mikroorganismy, které hrají důležitou roli pro využití dusíkatých hnojiv založených na bázi močoviny (Mobley a Hausinger, 1989). Produkce bakteriocinů hraje významnou roli jak pro samotné organismy (inhibice růstu konkurenční mikroflóry), tak pro člověka (ochrana potravin, probiotika) (Gálvez a kol., 2008, Khan a kol., 2010).

Citlivost studovaných kmenů k antibiotikům byla poměrně vysoká. Všechny kmeny byly citlivé k vankomycinu, ampicilinu, erythromycinu a chloramfenikolu. Pouze jeden kmen *E. moraviensis* a dva kmeny *E. haemoperoxidus* byly rezistentní ke kanamycinu, jeden kmen *E. haemoperoxidus* byl rezistentní k rifampicinu a jeden kmen *E. haemoperoxidus* a jeden *E. moraviensis* byly rezistentní k novobiocinu. Ureázová aktivita byla u obou druhů poměrně nízká. Pouze jeden kmen *E. haemoperoxidus* a jeden *E. moraviensis* vykázal aktivitu > 10 nkat/ml. Mezi kmeny *E. haemoperoxidus* byly nalezeny geny pro enterociny A, B, P a L50B zatímco u *E. moraviensis* nebyl detekován gen pro enterocin B. Schopnost inhibovat jiné bakterie byla detekována pouze u jednoho kmene *E. haemoperoxidus*, který byl aktivní proti všem 21 testovaným indikátorovým kmenům zahrnujícím *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *Listeria innocua* a *Staphylococcus* sp. Částečně přečištěná bakteriocinogenní substance z tohoto kmene byla aktivní i po 5 měsících skladování ve 4°C a -20°C, ale byla inaktivována proteolytickými enzymy, což je typické pro bakteriociny skupiny II. Testování citlivosti obou druhů k enterocinům A a M ukázalo, že většina kmenů *E. haemoperoxidus* (15) i *E. moraviensis* (6) byla citlivá k enterocinu A. K enterocinu M byly citlivé všechny kmeny *E. moraviensis*, ale pouze 10 kmenů *E. haemoperoxidus*.

Poznatky získané v této práci rozšířily znalosti o druzích *E. haemoperoxidus* a *E. moraviensis* a přispěly k problematice výzkumu bakteriocinů i citlivosti k nim u zástupců rodu *Enterococcus*.

11.11. Švec, P., Vandamme, P., Bryndová, H., Holochová, P., Kosina, M., Mašlaňová, I., Sedláček, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1499-1505.

*Autorský podíl uchazeče: 65 %*

Přestože byl výskyt enterokoků na rostlinách dokumentován již Mundtem v roce 1961, který zjistil, že jsou enterokoky mezi rostlinami přenášeny hmyzem a větrem, a že jsou schopné se zde i omezeně množit, není povrch rostlin považován za typický habitat enterokoků a prací zabývajících se touto problematikou bylo celkově publikováno jen malé množství (Müller a kol., 2001, Ott a kol., 2001). Popis druhu *E. plantarum*, který je náplní této komentované publikace, vycházel částečně z výsledků diplomové práce řešené na našem pracovišti (Bryndová, 2010). V rámci této diplomové práce bylo pomocí konvenčních a komerčních morfologických, fyziologických a biochemických testů a metody rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> charakterizováno 94 bakteriálních kmenů izolovaných z nadzemních částí rostlin na Kanamycin Aesculin Azide (KAA) agaru (Merck). Mimo zástupce druhů *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* a *E. mundtii* byla izolována také neidentifikovaná skupina 8 kmenů, které byly dále podrobně charakterizovány.

Analýzou rep-PCR profilů tvořilo všech osm studovaných kmenů jeden shluk, který byl jasně odlišený od zástupců zbývajících druhů enterokoků. Sekvence genu pro 16S rRNA, která byla stanovena u třech vybraných kmenů, zařadila studovanou skupinu do fylogenetické skupiny *E. faecalis*, kde byl fylogeneticky nejbližším druhem *E. moraviensis* (99,9 % podobnost). Separace studované skupiny kmenů od zbývajících *Enterococcus* spp. byla dále potvrzena sekvencí genů *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) a *rpoA* (kódujícího alfa podjednotku RNA polymerázy), analýzou celkových buněčných proteinů, metodou automatické ribotypizace systémem RiboPrinter (DuPont Qualicon) s restričním enzymem *EcoRI* a také pomocí enzymatických a biochemických testů. Pro tento nový druh bylo navrženo druhové jméno *plantarum*, které je odvozeno od *planta*, latinského termínu pro rostlinu.

Jedinou další doposud publikovanou prací týkající se tohoto druhu je charakteristika genomu kmene *E. plantarum* izolovaného z římského salátu v Kalifornii (You a kol., 2019). Velikost jeho genomu je 3 383 441 bp a obsahuje 3 218 protein-kódujících genů a 60 genů pro RNA a v jeho genomu nebyly nalezeny žádné geny pro antibiotickou rezistenci. Záchyt a popis *E. plantarum* z jiných zdrojů doposud v literatuře popsán nebyl, takže zatím není jasné, jedná-li se o druh typický pro rostliny nebo o ubikvitně rozšířený druh, jako je tomu u většiny zástupců fylogenetické skupiny druhu *E. faecalis*.



11.12. Frolková, P., Ghosh, A., Švec, P., Zurek, L., Literák, I. (2012). Use of the manganese-dependent superoxide dismutase gene *sodA* for rapid identification of recently described enterococcal species. *Folia Microbiol* 57, 439-442.

*Autorský podíl uchazeče: 20 %*

Jak již bylo diskutováno v kapitole 6, zabývající se využitím genotypizačních technik pro identifikaci enterokoků, představují metody sekvenace různých provozních genů vhodný nástroj pro identifikaci jednotlivých druhů. Jedním z těchto genů je gen *sodA* kódující mangan-dependentní superoxid dismutázu, který byl v taxonomii bakterií aplikován pro identifikaci řady taxonů, jako např. stafylokoků (Ghebremedhin a kol., 2008), streptokoků (Glazunova a kol., 2009), pasteurel (Gautier a kol., 2005) nebo nokardií (Sánchez-Herrera a kol., 2017).

V naší studii jsme navázali na práci Poyartové a kol. (2000), kteří tuto metodu pro identifikaci enterokoků evaluovali na souboru 19 typových kmenů tehdy známých *Enterococcus* spp. Metodika použitá v naší práci, sekvence primerů pro amplifikaci fragmentu *sodA* genu (438 bp) i podmínky PCR reakce byly shodné s postupem popsáním Poayartovou a kol. (2000). Tuto metodu jsme aplikovali na soubor 18 typových kmenů nověji popsaných *Enterococcus* spp., které nebyly v původní práci Poyartové a kol. v roce 2000 zařazeny. Jako referenční kmeny byly do našeho souboru zařazeny typové kmeny druhů *E. faecalis* a *E. faecium*.

Podobnost získaných sekvencí fragmentu *sodA* genu byla v rozsahu od 20.98 % (mezi *E. termitis* a *E. thailandicus*) do 89.26 % (mezi *E. haemoperoxidus* a *E. silensiacus*). Sekvenční shluková analýza jasně odlišila jednotlivé typové kmeny všech tehdy známých 35 druhů enterokoků. Topologie fylogenetického stromu i rozdělení jednotlivých druhů do vnitrodruhových fylogenetických skupin byly v souladu s fylogenezí podle genu pro 16S rRNA, avšak ve srovnání s tímto genem je *sodA* gen dostatečně diskriminativní i pro druhy, které mají velmi podobné sekvenční genu pro 16S rRNA. Naše výsledky tak potvrdily, že *sodA* gen je vhodnou alternativou pro identifikaci enterokoků. Výsledky této práce byly dále využity pro popis druhu *E. alcedinis* (kapitola 11.15.; **Frolková a kol., 2013**).

Od publikace této studie v roce 2012 byla sekvenace genu *sodA* aplikována pro identifikaci enterokoků z různých zdrojů (Alipour a kol., 2014, Dolka a kol., 2016, Talarmin a kol., 2011, Tan a kol., 2018, Wei a kol., 2017). Tato metoda je však využívána méně často než sekvenace genů *rpoA* (kódujícího alfa podjednotku RNA polymerázy), *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) nebo *atpA* (kódujícího alfa podjednotku ATP syntázy), které byly využity pro popisy řady nových druhů enterokoků a jsou popsány u řady recentně popsaných druhů (Harada a kol., 2016, Jin a kol., 2017, McLaughlin a kol., 2017, Techo a kol., 2019). Dostupnost více referenčních sekvencí *rpoA*, *pheS* a *atpA* v online databázích je tak možná důvodem k upřednostnění těchto genů pro identifikaci enterokoků před genem *sodA*.

11.13. Niemi, R.M., Ollinkangas, T., Paulin, L., Švec, P., Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M., Lindström, K. (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2169-2173.

*Autorský podíl uchazeče: 18 %*

Druh *E. rivorum* je dalším druhem enterokoka popsáným z vodních zdrojů. Jeho popis je založen na polyfázové taxonomické studii sedmi kmenů izolovaných z vod dvou čistých potoků ve Finsku, jejichž povodí bylo vzdálené od obytných, zemědělských i průmyslových lokalit. Tato skupina kmenů byla vybrána ze souboru neidentifikovaných kmenů enterokoků izolovaných v rámci předchozí práce finských autorů, která se zabývala popisem diverzity fekálních streptokoků izolovaných z environmentálních vzorků a živočišných zdrojů. Vybraná skupina byla v původní práci od ostatních enterokoků odlišena na základě analýzy celkových buněčných proteinů (Niemi a kol., 1993).

V naší práci byla studovaná skupina charakterizována sekvencováním genů pro 16S rRNA, *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) a *atpA* (kódujícího alfa podjednotku ATP syntázy). Fylogenetická analýza těchto sekvencí ukázala, že všechny kmeny reprezentují shodný taxon a zařadila studovanou skupinu do fylogenetické skupiny *E. faecalis*. Fylogeneticky nejbližším druhem byl *E. faecalis*, který vykazoval 98,7% podobnost genu pro 16S rRNA. Fenotypizace s využitím komerčních a konvenčních fyziologických a biochemických testů však tuto skupinu kmenů odlišovala od zbývajících druhů fylogenetické skupiny *E. faecalis*. Genetická homogenita studované skupiny a její odlišení od zástupců *Enterococcus* spp. bylo dále prokázáno metodou rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>, analýzou celkových buněčných proteinů a metodou DNA-DNA hybridizace, která definitivně potvrdila, že analyzované kmeny představují nový druh rodu *Enterococcus*.

V odborné literatuře je aktuálně pouze jedna zmínka o izolaci kmene *E. rivorum* z brazilského sýra (Luiz a kol., 2017), ale stejně jako v případě druhů *E. silesiacus* a *E. termitis* byl tento kmen identifikován jen na základě 99% podobnosti genu pro 16S rRNA, což je ve světle vysokých podobností sekvencí tohoto genu mezi různými druhy enterokoků poměrně nejistý výsledek identifikace.

11.14. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlanová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., Švec P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two novel urease-producing enterococci from the environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 502-510.

*Autorský podíl uchazeče: 20 %*

Obsahem této komentované publikace je taxonomická studie souboru 25 kmenů enterokoků izolovaných z vody, rostlin a z komárů. Celkem 11 kmenů z vod bylo izolováno v severomoravském regionu v rámci studie popsané v první komentované publikaci (kapitola 11.1.; Švec a Sedláček, 1999), dalších 11 kmenů z rostlin bylo na našem pracovišti izolováno při řešení diplomové práce Bryndové (2010) a zbývající tři kmeny byly izolovány z komárů rodu *Aedes vexans* a *Ochlerotatus cantans* odchytených v obci Lanžhot. Skutečnost, že by tato skupina kmenů mohla představovat dva nové druhy, byla naznačena výsledky metody rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> a fenotypizace pomocí fyziologických a biochemických testů.

V rámci studie byly dále všechny kmeny charakterizovány sekvencováním genů *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy) a *rpoA* (kódujícího alfa podjednotku RNA polymerázy), analýzou celkových buněčných proteinů, metodou automatické ribotypizace systémem RiboPrinter (DuPont Qualicon) s restričním enzymem *EcoRI* a fenotypovými testy. Všechny tyto metody shodně rozdělily studované kmeny do dvou shluků odlišených od zbývajících druhů rodu *Enterococcus*. Na základě výsledku sekvencování genu pro 16S rRNA byly obě skupiny zařazeny jako zástupci fylogenetické skupiny *E. faecalis*, kde nejbližší příbuzné druhy byly *E. silesiacus* a *E. caccae* vykazující podobnost 99,9 %. Následná DNA-DNA hybridizace mezi vybranými zástupci z obou skupin a typovými kmeny druhů skupiny *E. faecalis* finálně potvrdila, že obě skupiny představují dva nové druhy rodu *Enterococcus*, pro které byla navržena jména *E. ureilyticus* a *E. rotai*. Kmeny těchto druhů vykazovaly silnou ureázovou aktivitu, což bylo zohledněno při volbě jména *ureilyticus*. Druhý druh byl pojmenován na počest českého mikrobiologa RNDr. Jiřího Rotty (\*1925 - †1989), který svůj odborný a vědecký život spojil se streptokokovou problematikou. Od roku 1965 byl vedoucím Národní referenční laboratoře pro streptokoky a enterokoky ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ) v Praze a od roku 1966 ředitelem WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Streptococci v Praze (MUDr. Pavla Křížová, CSc., SZÚ, Praha, osobní sdělení).

S ohledem na poměrně vysoký počet kmenů, které byly v rámci našich výzkumných aktivit pro popis *E. ureilyticus* a *E. rotai* izolovány, i s přihlédnutím na jejich výskyt ve vodě a na rostlinách, je překvapivé, že záchyt těchto dvou druhů nebyl zatím jinými autory v odborné literatuře popsán. Vzhledem k různým zdrojům jejich izolace na různých lokalitách se však lze domnívat, že oba druhy jsou běžnou součástí environmentální mikroflóry.

11.15. Frolková, P., Švec, P., Sedláček, I., Mašlanová, I., Černošlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměřský, T., Literák, I. (2013). *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3069-3074.

*Autorský podíl uchazeče: 20 %*

Poslední popisnou prací z tohoto souboru komentovaných publikací je taxonomická studie dvou kmenů izolovaných v rámci projektu studia mikroflóry volně žijících ptáků. Kmeny byly vykultivovány ze stěrů z kloaky ledňáčka říčního (*Alcedo atthis*) odebraných na dvou lokalitách v regionu města Vlašim ve Středočeském kraji. Základní fenotypové znaky obou kmenů korespondovaly s charakteristikou rodu *Enterococcus*, ale metodou rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>, která byla ve zmíněné studii použita pro rychlou primární genotypovou charakterizaci izolovaných kmenů bakterií, tvořily oba kmeny totožný profil jasně odlišený od zbývajících referenčních kmenů.

Analýza sekvence genu pro 16S rRNA zařadila oba kmeny do rodu *Enterococcus*, kde byl fylogeneticky nejbližším druhem *E. aquimarinus* s podobností sekvence pouze 97,1 %. Již tato nízká hodnota podobnosti naznačila, že se s největší pravděpodobností jedná o nový druh. Pro další podrobnou taxonomickou charakterizaci byly oba kmeny analyzovány metodami sekvenace genů *sodA* (kódujícího mangan-dependentní superoxid dismutázu), *rpoA* (kódujícího alfa podjednotku RNA polymerázy) a *pheS* (kódujícího alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy), analýzou celkových buněčných proteinů a metodou automatické ribotypizace systémem RiboPrinter (DuPont Qualicon) s restriční enzymem *EcoRI*. Výsledky všech těchto metod jasně ukázaly, že oba kmeny představují zástupce totožného druhu odlišného od všech v té době popsaných enterokoků, pro který bylo navrženo jméno *E. alcedinis*, odvozené od zdroje izolace obou kmenů, latinského pojmenování ledňáčka (*Alcedo*).

Mimo naši práci byl druh *E. alcedinis* izolován jako součást mikroflóry trávicího traktu selat (Gan a kol., 2019), kde byl detekován sekvenací DNA fragmentu V3 regionu genu pro 16S rRNA získaného denaturační gradientovou elektroforézou. Podobnost sekvence tohoto fragmentu se sekvencí typového kmene *E. alcedinis* však byla pouze 98 %, což není pro spolehlivou identifikaci dostačující. Žádná další zmínka o záchytu tohoto druhu nebyla v dostupné odborné literatuře nalezena.

11.16. Beneš J., Džupová, O., Šetina, M., Feuereisl, R., Švec, P., Pantůček, R. (2013). Relapsing endocarditis caused by *Enterococcus faecalis* forming small colony variants. *Scand J Inf Dis* 45, 800-803

*Autorský podíl uchazeče: 15 %*

Pomalou rostoucí subpopulace bakteriálních kmenů, které vykazují morfologické a metabolické odlišnosti od původního kmene, jsou označovány jako tzv. SCV kmeny (z angl. Small Colony Variants). Tyto kmeny vykazují ve srovnání s většinovou buněčnou populací vyšší rezistenci k antibiotikům i perzistenci v organismu, takže jsou často původci chronických, rekurentních a obtížně léčitelných infekcí. Díky pomalému růstu a změněnému fenotypu jsou SCV kmeny v klinických laboratořích obtížně identifikovatelné (Proctor a kol., 2006, Sendi a Proctor, 2009).

Tato komentovaná publikace popisuje případ opakující se endokarditidy u muže, 63 let. Při první infekci i při jejím následném opakování po pěti týdnech byl z hemokultur zachycen kmen *E. faecalis* běžného fenotypu, který dobře reagoval na antibiotickou terapii. Po třetí recidivě infekce bylo přistoupeno k chirurgickému zákroku, který odhalil poškození srdečních tkání v důsledku infekce. Byla provedena náhrada poškozené mitrální chlopně a odstranění nalezeného zánětlivého ložiska v srdeční tkáni. Pooperační průběh i další léčba antibiotiky proběhla bez komplikací a po dobu dalších dvou let sledování pacienta již k opakování infekce nedošlo. Z hemokultur byly po třetí recidivě zachyceny dva kmeny lišící se vizuálně velikostí kolonií. Jeden kmen tvořil na krevním agaru bílé kolonie o velikosti typické pro druh *E. faecalis*, druhý tvořil kolonie velmi drobné. Oba kmeny byly podrobeny analýze metodou rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>. Výsledné profily PCR produktů obou kmenů byly totožné a jejich srovnání s referenční databází ukázalo, že se jedná o zástupce druhu *E. faecalis*. Klonální identita obou kmenů byla dále potvrzena makrorestrikční analýzou jejich celkové genomové DNA štěpené restriktivním enzymem *Sma*I, která také ukázala identické restriktivní profily. Testování auxotrofie izolovaného SCV kmene k heminu, nikotinamid adenin dinukleotidu, menadionu, thymidinu a thiaminu prokázalo, že se jedná o hemin-dependentní kmen. Tento kmen byl deponován na pracovišti České sbírky mikroorganismů (PřF MU, Brno) jako *E. faecalis* CCM 7854.

Druh *E. faecalis* je nejčastějším enterokokem, jehož SCV kmeny jsou v literatuře zmiňovány, což není s ohledem na jeho dominantní výskyt v humánním klinickém materiálu překvapivé. Mimo chronických endokarditid (Ogihara a kol., 2016, Wellinghausen a kol., 2009) byly SCV kmeny *E. faecalis* izolovány z infekce pupečnickového pahýlu novorozence (Kubota a kol., 2013). *Enterococcus faecalis* byl již popsán také z veterinárního klinického materiálu, a to konkrétně z infekcí kloubů kuřat (Petersen a kol., 2008). SCV dalších zástupců enterokoků byly popsány u druhu *E. faecium* z případu sepse onkologické pacientky (Gröbner a kol., 2012) a u komenzálních kmenů druhu *E. cecorum* izolovaných ze slepic, kachny a labutě (Jung a kol., 2017).

11.17. Šplíchalová, P., Švec, P., Ghosh, A., Zurek, L., Oravcová, V., Radiměšský, T., Bohuš, M., Literák, I. (2015). Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. *Anton Leeuw Int J G* 107, 1281-1289.

*Autorský podíl uchazeče: 20 %*

V rámci této studie byly charakterizovány enterokoky izolované ze vzorků z kloaky a uropygiální žlázy sedmi jedinců dudka chocholátého (*Upupa epops*) a z kloak 14 jedinců ledňáčka říčního (*Alcedo atthis*) a 22 jedinců mandelíka hajního (*Coracias garrulus*). Z uvedených vzorků bylo izolováno celkem 161 kmenů suspektních enterokoků, které byly dále identifikovány metodami rep-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub>, sekvencováním genů *sodA* a 16S rRNA a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Vybraní zástupci druhu *E. faecalis* byly dále charakterizovány makrorestrikční analýzou pomocí pulzní gelové elektroforézy a multilokusovou sekvenční analýzou založenou na sedmi genech. U všech izolovaných kmenů enterokoků byla dále diskovou difúzní metodou testována rezistence k ampicilinu, tetracyklinu, gentamicinu, vankomycinu a erythromycinu a metodou PCR byla testována přítomnost genů pro rezistenci k vankomycinu (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *van C2/C3*) a k erythromycinu (*ermA*, *ermB* a *mefA/E*).

Z celkového počtu 161 izolovaných kmenů bylo výše uvedenými metodami zařazeno 117 kmenů do rodu *Enterococcus* a dále bylo 114 kmenů identifikováno až na úroveň druhu. Nejpočetnějšími byli zástupci druhu *E. faecalis* (67 kmenů), kteří byli izolováni ze všech tří druhů ptáků. Dalšími izolovanými druhy pak byly *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. hirae* a *E. mundtii*. Makrorestrikční analýza pomocí pulzní gelové elektroforézy ukázala poměrně značnou genetickou variabilitu studovaného souboru kmenů. Klonálně příbuzné kmeny byly izolovány pouze z jedinců z jednoho hnízda. Multilokusová sekvenční analýza šesti kmenů *E. faecalis* z ledňáčka říčního zařadila tyto kmeny do sekvenčních typů izolovaných celosvětově z vod, drůbeže a člověka. Kromě dvou kmenů *E. faecalis*, u kterých byla prokázána intermediární rezistence k vankomycinu a erythromycinu, byly všechny kmeny k testovaným antibiotikům citlivé a u žádného z nich nebyla detekována přítomnost testovaných genů pro rezistenci k vankomycinu nebo erythromycinu.

Druhy enterokoků izolované z kloak a uropygiálních žláz studovaných ptáků se běžně vyskytují v prostředí a nebo již byly izolovány z jiných živočichů, takže z pohledu taxonomického nejsou výsledky této studie překvapivé. Podobné druhové spektrum enterokoků bylo z uropygiální žlázy dudků popsáno Solerem a kol. (2008) a bylo izolováno i z jiných divokých ptáků, jako například ze sov a dravců (Marrow a kol., 2009), z káněte lesního (Radhouani a kol., 2012) nebo zdivočelých domácích holubů (Radiměšský a kol., 2010). V naší práci však nebyly izolovány druhy *E. faecium* a *E. durans*, které tyto autoři také popisují. Obecně lze však shrnout, že druhy enterokoků izolované v této práci jsou pravděpodobně běžnou součástí intestinální mikroflóry divokých ptáků.

11.18. Oravcová, V., Švec, P., Literák, I. (2017). Vancomycin-resistant enterococci with *vanA* and *vanB* genes in Australian gulls. *Environ Microbiol Rep* 9, 316-318.

*Autorský podíl uchazeče: 15 %*

Poslední ze souboru komentovaných publikací popisuje izolaci dvou vankomycin rezistentních kmenů druhů *E. faecium* a *E. dispar* izolovaných z racků australských (*Chroicocephalus novaehollandiae*), které byly zachyceny v rámci analýzy enterokoků z 504 výtěrů kloak mláďat racků ze tří hnízdních kolonií v Novém Jižním Walesu v Austrálii. Izolované kmeny byly identifikovány metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a sekvencováním genu *sodA* kódujícího mangan-dependentní superoxid dismutázu. Taxonomické zařazení kmene *E. dispar* bylo dále potvrzeno metodou automatické ribotypizace s restriktivním enzymem *EcoRI* (RiboPrinter, DuPont Qualicon). Rezistence testovaných kmenů k antibiotikům byla testována diskovou difúzní metodou, byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) k vankomycinu a testována přítomnost genů rezistence k vankomycinu, erythromycinu, tetracyklinu a aminoglykosidům.

V rámci provedeného testování byly zachyceny dva kmeny nesoucí geny pro rezistenci v vankomycinu. První kmen, který byl izolován v Sydney, byl identifikován jako *E. faecium*. Kmen nesl gen *vanB* a jeho MIC k vankomycinu byla 64 mg/l. Druhý kmen izolovaný v oblasti chráněného přírodního parku Five Islands, byl identifikován jako *E. dispar*. Tento kmen nesl gen *vanA* a jeho MIC k vankomycinu byla 256 mg/l. Podrobnější analýza ukázala lokalizaci genu *vanA* na transposonu Tn1546 typ A. Oba kmeny byly dále rezistentní k erythromycinu, gentamicinu a rifampicinu. Kmen *E. faecium* byl rezistentní k ampicilinu a *E. dispar* k teikoplaninu. Multilokusová sekvenční analýza zařadila kmen *E. faecium* do sekvenčního typu (ST) 341, který je třetím nejrozšířenějším typem v Austrálii. Kmeny tohoto typu nesou v 90 % případů gen *vanB* a jsou nejčastějšími vankomycin rezistentními kmeny izolovanými v Austrálii z nemocničního prostředí.

Výsledky této práce jsou zajímavé jak z taxonomického, tak z epidemiologického pohledu. Druh *E. dispar* byl doposud izolován z humánního i veterinárního klinického materiálu (Švec a Franz, 2014a), z potravin (Lopes a kol., 2006) i z prostředí (Graves a Weaver, 2010). Jeho izolace je však poměrně vzácná a problematická může být také jeho biochemická identifikace (Citak a kol., 2005). Také detekce genů rezistence k vankomycinu je u tohoto druhu vzácná (Descheemaeker a kol., 2000). Tato práce je první studií popisující izolaci vankomycin rezistentních enterokoků z divoce žijících živočichů. Racci jsou všežravci, kteří žijí v blízké přítomnosti člověka a také se živí odpadky. Tím je na tyto živočichy pravděpodobně umožněn i přenos klinicky významných vankomycin rezistentních kmenů enterokoků typických pro člověka, které tak mohou být prostřednictvím ptáků přenášeny do dalších habitatů. Ujasnění zdrojů a cest přenosu těchto kmenů však vyžaduje další studie.

## 12. Literatura

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. a Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43, 5721-5732.
- Abbott, Y., Kirby, B. M., Karczmarczyk, M., Markey, B. K., Leonard, F. C. a Fitzgerald, S. (2009). High-level gentamicin-resistant and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a wound in a dog. *J Small Anim Pract* 50, 194-197.
- Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E. a Martínez-Bueno, M. (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 127, 200-208.
- Acedo, J. Z., Ibarra Romero, C., Miyata, S. T., Blaine, A. H., McMullen, L. M., Vederas, J. C. a van Belkum, M. J. (2017). Draft genome sequence of *Enterococcus canintestini* 49, a potential probiotic that produces multiple bacteriocins. *Genome Announc* 5, e01131-17.
- Adair, K. L., Wilson, M., Bost, A. a Douglas, A. E. (2018). Microbial community assembly in wild populations of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *ISME J* 12, 959-972.
- Aguirre, M. a Collins, M. D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75, 95-107.
- Ahmed, F. Z., Baig, M. W., Gascoyne-Binzi, D. a Sandoe, J. A. T. (2011). *Enterococcus cecorum* aortic valve endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70, 525-527.
- Ahmed, W., Neller, R. a Katouli, M. (2005). Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol* 71, 4461-4468.
- Albokari, M., Mashhour, I., Alshehri, M., Boothman, C. a Al-Enezi, M. (2015). Characterization of microbial communities in heavy crude oil from Saudi Arabia. *Ann Microbiol* 65, 95-104.
- Alipour, M., Hajiesmaili, R., Talebjannat, M. a Yahyapour, Y. (2014). Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *Sci World J* 2014, 287458.
- Allen, S. J., Okoko, B., Martinez, E., Gregorio, G. a Dans, L. F. (2004). Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004, str. CD003048. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Alves, P. I., Martins, M. P., Semedo, T., Marques, J. J. F., Tenreiro, R. a Crespo, M. T. B. (2004). Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Anton Leeuw Int J G* 85, 237-252.
- Anderson, J. F., Parrish, T. D., Akhtar, M., Zurek, L. a Hirt, H. (2008). Antibiotic resistance of enterococci in American bison (*Bison bison*) from a nature preserve compared to that of enterococci in pastured cattle. *Appl Environ Microbiol* 74, 1726-1730.
- Anderson, S. A., Turner, S. J. a Lewis, G. D. (1997). Enterococci in the New Zealand environment: implications for water quality monitoring. *Water Sci Technol* 35, 325-331.
- Andongma, A. A., Wan, L., Dong, Y.-C., li, P., Desneux, N., White, J. A. a Niu, C.-Y. (2015). Pyrosequencing reveals a shift in symbiotic bacteria populations across life stages of *Bactrocera dorsalis*. *Sci Rep* 5, 9470.
- Andrewes, F. W. a Horder, T. J. (1906). A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* 168, 708-713.
- Andrews, E. S., Xu, G. a Rich, S. M. (2014). Microbial communities within field-collected *Culiseta melanura* and *Coquillettia perturbans*. *Med Vet Entomol* 28, 125-132.
- Arias, C. A. a Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10, 266.
- Badgley, B. D., Nayak, B. S. a Harwood, V. J. (2010a). The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. *Water Res* 44, 5857-5866.



- Badgley, B. D., Thomas, F. I. M. a Harwood, V. J. (2010b).** The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of *Enterococcus* spp. *Environ Microbiol* 12, 1271-1281.
- Baele, M., Baele, P., Vanechoutte, M., Storms, V., Butaye, P., Devriese, L. A., Verschraegen, G., Gillis, M. a Haesebrouck, F. (2000).** Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 38, 4201-4207.
- Baele, M., Devriese, L. A., Butaye, P. a Haesebrouck, F. (2002).** Composition of enterococcal and streptococcal flora from pigeon intestines. *J Appl Microbiol* 92, 348-351.
- Bailey, G. D. a Love, D. N. (1991).** Oral associated bacterial infection in horses: studies on the normal anaerobic flora from the pharyngeal tonsillar surface and its association with lower respiratory tract and paraoral infections. *Vet Microbiol* 26, 367-379.
- Bailey, L. a Collins, M. D. (1982).** Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *J Appl Bacteriol* 53, 215-217.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., Franco, B., Converti, A. a Oliveira, R. P. D. (2013).** Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32, 134-142.
- Bale, M. J., Bennett, P. M., Beringer, J. E. a Hinton, M. (1993).** The survival of bacteria exposed to desiccation on surfaces associated with farm buildings. *J Appl Bacteriol* 75, 519-528.
- Ball, K. R., Rubin, J. E., Chirino-Trejo, M. a Dowling, P. M. (2008).** Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *Can Vet J* 49, 985-990.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. a Loureiro, V. (2012).** The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153, 243-259.
- Baudišová, D. (2017).** 5.2.3. Intestinální enterokoky. *Metody mikrobiologického rozboru vody (příručka pro hydroanalytické laboratoře)*, str. 56-59. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka.
- Bauer, S., Tholen, A., Overmann, J. a Brune, A. (2000).** Characterization of abundance and diversity of lactic acid bacteria in the hindgut of wood- and soil-feeding termites by molecular and culture-dependent techniques. *Arch Microbiol* 173, 126-137.
- Becquet, P. (2003).** EU assessment of enterococci as feed additives. *Int J Food Microbiol* 88, 247-254.
- Behr, T., Koob, C., Schedl, M., Mehlen, A., Meier, H., Knopp, D., Frahm, E., Obst, U., Schleifer, K. H., Niessner, R. a Ludwig, W. (2000).** A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol* 23, 563-572.
- Bell, R. G. a Gill, C. O. (1982).** Microbial spoilage of luncheon meat prepared in an impermeable plastic casing. *J Appl Bacteriol* 53, 97-102.
- Ben Belgacem, Z., Dousset, X., Prévost, H. a Manai, M. (2009).** Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with Tunisian fermented meat based on the heterogeneity of the 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region. *Arch Microbiol* 191, 711-720.
- Ben Braïek, O. a Smaoui, S. (2019).** Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Res Int* 2019, 5938210.
- Beneš, J., Džupová, O., Šetina, M., Feuereisl, R., Švec, P. a Pantůček, R. (2013).** Relapsing endocarditis caused by *Enterococcus faecalis* forming small colony variants. *Scand J Inf Dis* 45, 800-803.
- Benno, Y., Izumikurotani, A. a Yamashita, M. (1992).** Isolation and identification of intestinal bacteria from Japanese tree frog (*Hyla japonica*) with the special reference to anaerobic bacteria. *J Vet Med Sci* 54, 699-702.
- Betzl, D., Ludwig, W. a Schleifer, K. H. (1990).** Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 56, 2927-2929.
- Bhardwaj, A., Malik, R. K. a Chauhan, P. (2008).** Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian J Microbiol* 48, 317-325.
- Biavasco, F., Giovanetti, E., Miele, A., Vignaroli, C., Facinelli, B. a Varaldo, P. E. (1996).** In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between enterococci and listeriae of different species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15, 50-59.

**Björkroth, J., Ristiniemi, M., Vandamme, P. a Korkeala, H. (2005).** *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6°C. *Int J Food Microbiol* 97, 267-276.

**Bopp, L. H., Schoonmaker, D. J., Baltch, A. L., Smith, R. P. a Ritz, W. J. (1999).** Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from 6 hospitals in New York State. *Am J Infect Control* 27, 411-417.

**Bosshard, P. P., Abels, S., Altwegg, M., Bottger, E. C. a Zbinden, R. (2004).** Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative Gram-positive cocci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 42, 2065-2073.

**Bourgogne, A., Garsin, D. A., Qin, X., Singh, K. V., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Buhay, C., Shen, H., Chen, G., Williams, G., Muzny, D., Maadani, A., Fox, K. A., Gioia, J., Chen, L., Shang, Y., Arias, C. A., Nallapareddy, S. R., Zhao, M., Prakash, V. P., Chowdhury, S., Jiang, H. Y., Gibbs, R. A., Murray, B. E., Highlander, S. K. a Weinstock, G. M. (2008).** Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OGIRF. *Genome Biol* 9, R110.

**Bourne, R., Himmelreich, U., Sharma, A., Mountford, C. a Sorrell, T. (2001).** Identification of *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate cultures. *J Clin Microbiol* 39, 2916-2923.

**Brede, D. A., Snipen, L. G., Ussery, D. W., Nederbragt, A. J. a Nes, I. F. (2011).** Complete genome sequence of the commensal *Enterococcus faecalis* 62, isolated from a healthy Norwegian infant. *J Bacteriol* 193, 2377-2378.

**Brune, A. a Friedrich, M. (2000).** Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Curr Opin Microbiol* 3, 263-269.

**Bryndová, H. (2010).** Identifikace a typizace environmentálních kmenů rodu *Enterococcus*. *Diplomová práce, Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita.

**Butaye, P., Devriese, L. A., Goossens, H., Ieven, M. a Haesebrouck, F. (1999).** Enterococci with acquired vancomycin resistance in pigs and chickens of different age groups. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 365-366.

**Byappanahalli, M. a Fujioka, R. (2004).** 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* 50, 27-32.

**Byappanahalli, M. N., Shively, D. A., Nevers, M. B., Sadowsky, M. J. a Whitman, R. L. (2003).** Growth and survival of *Escherichia coli* and enterococci populations in the macro-alga *Cladophora* (Chlorophyta). *FEMS Microbiol Ecol* 46, 203-211.

**Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R. a Harwood, V. J. (2012a).** Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 685-706.

**Byappanahalli, M. N., Roll, B. M. a Fujioka, R. S. (2012b).** Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's soil environments. *Microbes Environ* 27, 164-170.

**Cahill, M. M. (1990).** Bacterial flora of fishes: a review. *Microb Ecol* 19, 21-41.

**Cai, Y. M., Suyanandana, P., Saman, P. a Benno, Y. (1999).** Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol* 45, 177-184.

**Carvalho, M. G. S., Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Sampson, A. J., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M. a Facklam, R. R. (2006).** *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1505-1508.

**Carvalho, M. G. S., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Shewmaker, P. L., Falsen, E., Facklam, R. R. a Teixeira, L. M. (2008).** Designation of the provisional new *Enterococcus* species CDC PNS-E2 as *Enterococcus sanguinicola* sp. nov., isolated from human blood, and identification of a strain previously named *Enterococcus* CDC PNS-E1 as *Enterococcus italicus* Fortina, Ricci, Mora, and Manachini 2004. *J Clin Microbiol* 46, 3473-3476.

**Citak, S., Yucel, N. a Mendi, A. (2005).** Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *J Food Process Preserv* 29, 183-195.

**Cocconcelli, P. S., Porro, D., Galandini, S. a Senini, L. (1995).** Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol* 21, 376-379.

**Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. a Comi, G. (2001).** Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* 67, 5113-5121.

**Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A. a Rodriguez, J. (2009).** Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 48, 523-528.

**Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilpper-Bälz, R. a Schleifer, K. H. (1984).** *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 34, 220-223.

**Collins, M. D., Farrow, J. A. E. a Jones, D. (1986).** *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 36, 8-12.

**Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A. E. a Williamson, R. (1989).** *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* 57, 283-288.

**Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Pigott, N. E. a Facklam, R. R. (1991).** *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett Appl Microbiol* 12, 95-98.

**Colombo, E., Franzetti, L., Frusca, M. a Scarpellini, M. (2010).** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Italian goat cheese. *J Food Prot* 73, 657-662.

**Contreras, G. A., Munita, J. M. a Arias, C. A. (2019).** Novel strategies for the management of vancomycin-resistant enterococcal infections. *Curr Infect Dis Rep* 21, 22.

**European Centre for Disease Prevention and Control (2018a).** Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. *Annual Epidemiological Report for 2016*, ECDC, Stockholm.

**European Centre for Disease Prevention and Control (2018b).** Healthcare-associated infections: surgical site infections. *Annual Epidemiological Report for 2016*, ECDC, Stockholm.

**Correia Santos, S., Fraqueza, M. J., Elias, M., Salvador Barreto, A. a Semedo-Lemsaddek, T. (2017).** Traditional dry smoked fermented meat sausages: characterization of autochthonous enterococci. *LWT-Food Sci Technol* 79, 410-415.

**Cosentino, S., Pisano, M. B., Corda, A., Fadda, M. E. a Piras, C. (2004).** Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *J Dairy Res* 71, 444-450.

**Cotta, M., Whitehead, T., Falsen, E., Moore, E. a Lawson, P. (2013).** Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Anton Leeuw Int J G* 103, 89-98.

**Cui, H., Yang, K., Pagaling, E. a Yan, T. (2013).** Spatial and temporal variation in enterococcal abundance and its relationship to the microbial community in Hawaii beach sand and water. *Appl Environ Microbiol* 79, 3601-3609.

**D'Souza, A. L., Rajkumar, C., Cooke, J. a Bulpitt, C. J. (2002).** Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Brit Med J* 324, 1361-1364.

**Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Vilalta, N. E., Swings, J., Fruekilde, P. a Leisner, J. J. (2003).** Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 °C and 25 °C. *J Appl Microbiol* 94, 80-89.

**Dalsgaard, A., Forslund, A. a Fussing, V. (1999).** Traditional ribotyping shows a higher discrimination than the automated RiboPrinter™ system in typing *Vibrio cholerae* O1. *Lett Appl Microbiol* 28, 327-333.

**Damborg, P., Top, J., Hendrickx, A. P. A., Dawson, S., Willems, R. J. L. a Guardabassi, L. (2009).** Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol* 75, 2360-2365.

**Day, A. M., Sandoe, J. A. T., Cove, J. H. a Phillips-Jones, M. K. (2001).** Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Lett Appl Microbiol* 33, 392-396.

- de Assis, A. R., Feliciano, M. A. R., Facco, G. G., Ishii, P. E., Martin, C. M. a Fernandes, C. E. (2017). Canine fetal peritonitis. *Acta Sci Vet* 45, 192.
- de Freitas, A. D. R., Faria, A. R., Pinto, T. D. A., Merquior, V. L. C., Neves, D. M., da Costa, R. D. a Teixeira, L. M. (2018). Distribution of species and antimicrobial resistance among enterococci isolated from the fecal microbiota of captive blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*) in Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* 615, 1428-1437.
- De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., Swings, J. a Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcicus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1069-1074.
- De Graef, E. M., Devriese, L. A., Baele, M., Vancanneyt, M., Swings, J., Haesebrouck, F. a Decostere, A. (2005). Identification of enterococcal, streptococcal and *Weissella* species in the faecal flora of individually owned dogs. *J Appl Microbiol* 99, 348-353.
- de Jong, A., Simjee, S., Garch, F. E., Moyaert, H., Rose, M., Youala, M. a Dry, M. (2018). Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from healthy cattle, pigs and chickens in nine EU countries (EASSA Study) to critically important antibiotics. *Vet Microbiol* 216, 168-175.
- de Vaux, A., Laguerre, G., Divies, C. a Prevost, H. (1998). *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int J Syst Bacteriol* 48, 383-387.
- Deibel, R. H., Lake, D. E. a Niven, C. F., Jr. (1963). Physiology of the enterococci as related to their taxonomy. *J Bacteriol* 86, 1275-1282.
- Deibel, R. H. (1964). The group D streptococci. *Bacteriol Rev* 28, 330-366.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P. a Goossens, H. (1997). Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol* 47, 555-561.
- Descheemaeker, P., Ieven, M., Chapelle, S., Lammens, C., Hauchecorne, M., Wijdooghe, M., Vandamme, P. a Goossens, H. (2000). Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. *J Inf Dis* 181, 235-241.
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. a Palmer, C. J. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl Environ Microbiol* 68, 1165-1172.
- Devriese, L. A., Van de Kerckhove, A., Kilpper-Bälz, R. a Schleifer, K. H. (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int J Syst Bacteriol* 37, 257-259.
- Devriese, L. A., Ceysens, K., Rodrigues, U. M. a Collins, M. D. (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett* 71, 247-252.
- Devriese, L. A., Homme, J., Wijfels, R. a Haesebrouck, F. (1991). Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J Appl Bacteriol* 71, 46-50.
- Devriese, L. A., Colque, J. I. C., Deherdt, P. a Haesebrouck, F. (1992a). Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol* 73, 421-425.
- Devriese, L. A., Laurier, L., Deherdt, P. a Haesebrouck, F. (1992b). Enterococcal and streptococcal species isolated from feces of calves, young cattle and dairy cows. *J Appl Bacteriol* 72, 29-31.
- Devriese, L. A., Pot, B. a Collins, M. D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Microbiol* 75, 399-408.
- Devriese, L. A. a Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, str. 327-367. Editor B. J. B. Wood a W. H. Holzappel. London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Descheemaeker, P., Baele, M., Van Landuyt, H. W., Gordts, B., Butaye, P., Swings, J. a Haesebrouck, F. (2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J Appl Microbiol* 92, 821-827.
- Diaz, M. A., Bik, E. M., Carlin, K. P., Venn-Watson, S. K., Jensen, E. D., Jones, S. E., Gaston, E. P., Relman, D. A. a Versalovic, J. (2013). Identification of *Lactobacillus* strains with probiotic features from the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Appl Microbiol* 115, 1037-1051.

**Dicks, L. M. T. a Holzapfel, W. H. (2009).** Genus II. *Melissococcus* Bailey and Collins 1983, 672<sup>VP</sup>. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes*, str. 607-611. Editor P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer a W. B. Whitman. New York, USA: Springer.

**Dicks, L. M. T., Geldenhuys, J., Mikkelsen, L. S., Brandsborg, E. a Marcotte, H. (2018).** Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. *Benef Microbes* 9, 3-20.

**Dicuonzo, G., Gherardi, G., Lorino, G., Angeletti, S., Battistoni, F., Bertuccini, L., Creti, R., Di Rosa, R., Venditti, M. a Baldassarri, L. (2001).** Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 201, 205-211.

**Dolka, B., Boyen, F., Butaye, P., Heidemann Olsen, R., Naundrup Thøfner, I. C. a Christensen, J. P. (2015).** Draft genome sequences of two commensal *Enterococcus cecorum* strains isolated from chickens in Belgium. *Genome Announc* 3, e01108-15.

**Dolka, B., Chrobak-Chmiel, D., Makrai, L. a Szeleszczuk, P. (2016).** Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus cecorum* strains associated with infections in poultry. *BMC Vet Res* 12, 129-129.

**Dolka, B., Golebiewska-Kosakowska, M., Krajewski, K., Kwiecinski, P., Nowak, T., Szubstarski, J., Wilczynski, J. a Szeleszczuk, P. (2017).** Occurrence of *Enterococcus* spp. in poultry in Poland based on 2014-2015 data. *Med Weter* 73, 220-224.

**Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K. a Chakraborty, T. (2007).** Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int J Med Microbiol* 297, 533-539.

**Duran, M., Yurtsever, D. a Dunaev, T. (2009).** Choice of indicator organism and library size considerations for phenotypic microbial source tracking by FAME profiling. *Water Sci Technol* 60, 2659-2668.

**Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C. a Cotter, P. D. (2016).** Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Front Microbiol* 7, 461.

**Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M. a Bercovier, H. (1996).** *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol* 32, 85-88.

**Ennahar, S. a Cai, Y. (2005).** Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 589-592.

**Facklam, R. a Elliott, J. A. (1995).** Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev* 8, 479-495.

**Facklam, R. R. (2001).** Newly described, difficult-to-identify, catalase-negative, Gram-positive cocci. *Clin Microbiol Newslet* 23, 1-7.

**Farrow, J. A. E. a Collins, M. D. (1985).** *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino-acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol* 35, 73-75.

**Fei, C., Lu, X. M., Qian, Y. H., Zhang, H. Y. a Mahmood, Q. (2006).** Identification of *Enterococcus* sp. from midgut of silkworm based on biochemical and 16S rDNA sequencing analysis. *Ann Microbiol* 56, 201-205.

**Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

**Ferguson, D. M., Moore, D. F., Getrich, M. A. a Zhouandai, M. H. (2005).** Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *J Appl Microbiol* 99, 598-608.

**Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L. a Araújo, W. L. (2008).** Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett* 287, 8-14.

**Fisher, K. a Phillips, C. (2009).** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol* 155, 1749-1757.

**Fortin, M., Messier, S., Pare, J. a Higgins, R. (2003).** Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, Gram-positive cocci isolated from milk samples. *J Clin Microbiol* 41, 106-109.

**Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D. a Manachini, P. L. (2004).** Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1717-1721.

**Foulquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. a De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106, 1-24.

**Frankenberg, L., Brugna, M. a Hederstedt, L. (2002).** *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *J Bacteriol* 184, 6351-6356.

**Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. a Stiles, M. E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* 47, 1-24.

**Franz, C. M. A. P., Abriouel, H., Holzapfel, W. H. a Galvez, A. (2002).** Of enterococci and food. *Australas Biotechnol* 12, 31-37.

**Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. a Holzapfel, W. H. (2003).** Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88, 105-122.

**Franz, C. M. A. P. a Holzapfel, W. H. (2004).** The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, str. 199-247. Editor S. Salminen, A. von Wright a A. Ouwehand. New York: Marcel Dekker, Inc.

**Franz, C. M. A. P., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H. a Galvez, A. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31, 293-310.

**Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. a Gálvez, A. (2011).** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151, 125-140.

**Frolková, P., Ghosh, A., Švec, P., Zurek, L. a Literák, I. (2012).** Use of the manganese-dependent superoxide dismutase gene *sodA* for rapid identification of recently described enterococcal species. *Folia Microbiol* 57, 439-442.

**Frolková, P., Švec, P., Sedláček, I., Mašlaňová, I., Černošlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměšský, T. a Literák, I. (2013).** *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3069-3074.

**Fujioka, R., Sian-Denton, C., Borja, M., Castro, J. a Morphew, K. (1998).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Guam's streams. *J Appl Microbiol* 85, 83S-89S.

**Gaglio, R., Francesca, N., Maniaci, G., Corona, O., Alfonzo, A., Giosuè, C., Di Noto, A., Cardamone, C., Sardina, M. T., Portolano, B. a Alabiso, M. (2016).** Valorization of indigenous dairy cattle breed through salami production. *Meat Sci* 114, 58-68.

**Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E. a Ben Omar, N. (2008).** Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28, 125-152.

**Gan, Z., Wei, W., Li, Y., Wu, J., Zhao, Y., Zhang, L., Wang, T. a Zhong, X. (2019).** Curcumin and resveratrol regulate intestinal bacteria and alleviate intestinal inflammation in weaned piglets. *Molecules* 24, 1220.

**García-Solache, M. a Rice, L. B. (2019).** The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 32, e00058-18.

**Garg, S. K. a Mital, B. K. (1991).** Enterococci in milk and milk-products. *Crit Rev Microbiol* 18, 15-45.

**Gautier, A.-L., Dubois, D., Escande, F., Avril, J.-L., Trieu-Cuot, P. a Gaillot, O. (2005).** Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol* 43, 2307-2314.

**Geiger, A., Fardeau, M.-L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., Cuny, G., Truc, P. a Ollivier, B. (2009).** First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infect Genet Evol* 9, 1364-1370.

**Genthner, F. J., James, J. B., Yates, D. F. a Friedman, S. D. (2005).** Use of composite data sets for source-tracking enterococci in the water column and shoreline interstitial waters on Pensacola Beach, Florida. *Mar Pollut Bull* 50, 724-732.

**Ghebremedhin, B., Layer, F., Konig, W. a Konig, B. (2008).** Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J Clin Microbiol* 46, 1019-1025.

**Giebel, R. A., Fredenberg, W. a Sandrin, T. R. (2008).** Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res* 42, 931-940.

**Giraffa, G. (2002).** Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 26, 163-171.

**Giraffa, G. (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88, 215-222.

**Glazunova, O. O., Raoult, D. a Roux, V. (2009).** Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2317-2322.

**Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B. a Zdovc, I. (2019).** Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *Biomed Res Int* 2019, 2815279.

**Goodacre, R., Timmins, E. M., Rooney, P. J., Rowland, J. J. a Kell, D. B. (1996).** Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol Lett* 140, 233-239.

**Graham, N. C. a Bartley, E. O. (1939).** Some observations on the classification of enterococci. *J Hyg (Lond)* 39, 538-552.

**Grant, S. B., Sanders, B. F., Boehm, A. B., Redman, J. A., Kim, J. H., Mrše, R. D., Chu, A. K., Gouldin, M., McGee, C. D., Gardiner, N. A., Jones, B. H., Svejkovsky, J., Leipzig, G. V. a Brown, A. (2001).** Generation of enterococci bacteria in a coastal saltwater marsh and its impact on surf zone water quality. *Environ Sci Technol* 35, 2407-2416.

**Graves, A. K. a Weaver, R. W. (2010).** Characterization of enterococci populations collected from a subsurface flow constructed wetland. *J Appl Microbiol* 108, 1226-1234.

**Grimont, F. a Grimont, P. A. D. (1986).** Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* 137B, 165-175.

**Gröbner, S., Beck, J., Schaller, M., Autenrieth, I. B. a Schulte, B. (2012).** Characterization of an *Enterococcus faecium* small-colony variant isolated from blood culture. *Int J Med Microbiol* 302, 40-44.

**Habermann, W., Zimmermann, K., Skarabis, H., Kunze, R. a Rusch, V. (2002).** Reduction of acute recurrence in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis by treatment with a bacterial immunostimulant (*Enterococcus faecalis* bacteriae of human origin). *Arzneimittel-Forschung* 52, 622-7.

**Hagi, T. a Hoshino, T. (2009).** Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 1479-1483.

**Hall, L. M. C., Duke, B., Guiney, M. a Williams, R. (1992).** Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. *J Clin Microbiol* 30, 915-919.

**Hammad, A. M., Shimamoto, T. a Shimamoto, T. (2014).** Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Microbiol* 38, 62-66.

**Hammerum, A. M. (2012).** Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin Microbiol Infect* 18, 619-625.

**Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. a Hammami, R. (2018).** The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front Microbiol* 9, 1791.

**Harada, T., Dang, V. C., Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., Nakamura, S., Uchida, K., Jinnai, M., Yonogi, S., Kawahara, R., Kanki, M., Kawai, T., Kumeda, Y. a Yamamoto, Y. (2016).** *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 3779-3785.

**Hardina, C. M. a Fujioka, R. S. (1991).** Soil: the environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environ Toxicol Water Quality* 6, 185-195.

Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C. A., Frimodt-Møller, N. a Aarestrup, F. M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 52, 139.

Haugland, R. A., Siefiring, S. C., Wymer, L. J., Brenner, K. P. a Dufour, A. P. (2005). Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Res* 39, 559-568.

Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R., Woods, C., Versalovic, J. a Lupski, J. R. (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 43, 199-207.

Higashide, T., Takahashi, M., Kobayashi, A., Ohkubo, S., Sakurai, M., Shirao, Y., Tamura, T. a Sugiyama, K. (2005). Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *J Clin Microbiol* 43, 1475-1476.

Higashiguchi, D. T., Husseneder, C., Grace, J. K. a Berestecky, J. M. (2006). *Pilibacter termitis* gen. nov., sp. nov., a lactic acid bacterium from the hindgut of the Formosan subterranean termite (*Coptotermes formosanus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 15-20.

Holzappel, W., Arini, A., Aeschbacher, M., Coppolecchia, R. a Pot, B. (2018). *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef Microbes* 9, 375-388.

Hölzel, C. S., Schwaiger, K., Harms, K., Küchenhoff, H., Kunz, A., Meyer, K., Müller, C. a Bauer, J. (2010). Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ Res* 110, 318-326.

Holzknicht, B. J., Dargis, R., Pedersen, M., Pinholt, M., Christensen, J. J., Hammerum, A. M., Littauer, P., Worning, P., Westh, H., Moser, C., Justesen, U. S., Lemming, L. E., Søndergaard, T. S., Dzajic, E. a Ejlersen, T. (2018). Typing of vancomycin-resistant enterococci with MALDI-TOF mass spectrometry in a nosocomial outbreak setting. *Clin Microbiol Infect* 24, 1104.e1.

Hugas, M., Garriga, M. a Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* 88, 223-233.

Hussain, M., Qamarunnissa, S., Raza, S., Qureshi, J., Wajid, A. a Rasool, S. (2009). DNA photolyase of enterococci: possible explanation for its low sunlight inactivation rate. *Biologia* 64, 852-858.

Hutchins, R. G., Bailey, C. S., Jacob, M. E., Harris, T. L., Wood, M. W., Saker, K. E. a Vaden, S. L. (2013). The effect of an oral probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Bacillus* species on the vaginal microbiota of spayed female dogs. *J Vet Intern Med* 27, 1368-1371.

Chandel, K., Mendki, M. J., Parikh, R. Y., Kulkarni, G., Tikar, S. N., Sukumaran, D., Prakash, S., Parashar, B. D., Shouche, Y. S. a Veer, V. (2013). Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PLoS ONE* 8, e80453.

Channaiah, L. H., Subramanyam, B., McKinney, L. J. a Zurek, L. (2010). Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. *FEMS Microbiol Ecol* 74, 464-471.

Chanter, N. (1997). Streptococci and enterococci as animal pathogens. *J Appl Microbiol* 83, S100-S109.

Charrier, M., Combet-Blanc, Y. a Ollivier, B. (1998). Bacterial flora in the gut of *Helix aspersa* (Gastropoda Pulmonata): evidence for a permanent population with a dominant homolactic intestinal bacterium, *Enterococcus casseliflavus*. *Can J Microbiol* 44, 20-27.

Charrier, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Ainouche, K. a Andant, G. (2006). Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biol Res* 39, 669-681.

Chen, Y.-S., Wu, H.-C., Lo, H.-Y., Hsu, W.-H., Lin, W.-C. a Lin, B.-Y. (2012). Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from Shao-jiou-luo (fermented zoned cerith), a traditional fermented food in Taiwan. *J Aquat Food Prod Technol* 22, 543-550.

Chen, Y.-s., Lin, Y.-h., Pan, S.-f., Ji, S.-h., Chang, Y.-c., Yu, C.-r., Liou, M.-s., Wu, H.-c., Otaguro, M., Yanagida, F., Liao, C.-c., Chiu, C.-m. a Huang, B.-q. (2013a). *Enterococcus saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* subsp. nov., isolated from broccoli. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4691-4697.



**Chen, Y. S., Liou, M. S., Ji, S. H., Yu, C. R., Pan, S. F. a Yanagida, F. (2013b).** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-tsai-shin (fermented broccoli stems), a traditional fermented food in Taiwan. *J Appl Microbiol* 115, 125-132.

**Chenoweth, C. a Schaberg, D. (1990).** The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9, 80-89.

**Christ, A. P. G., Ramos, S. R., Cayô, R., Gales, A. C., Hachich, E. M. a Sato, M. I. Z. (2017).** Characterization of *Enterococcus* species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. *Mar Pollut Bull* 118, 376-381.

**Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S. a Trujillo, M. E. (2018).** Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68, 461-466.

**Jackson, C. R., Lombard, J. E., Dargatz, D. A. a Fedorka-Cray, P. J. (2011).** Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Lett Appl Microbiol* 52, 41-48.

**Jayarao, B. M., Dore, J. J. E. a Oliver, S. P. (1992).** Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. *J Clin Microbiol* 30, 2235-2240.

**Jett, B. D., Huycke, M. M. a Gilmore, M. S. (1994).** Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7, 462-478.

**Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J. a Rodríguez, J. M. (2005).** Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51, 270-274.

**Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernández, L. a Rodríguez, J. M. (2008).** Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 159, 187-193.

**Jin, D., Yang, J., Lu, S., Lai, X.-H., Xiong, Y. a Xu, J. (2017).** *Enterococcus wangshanyuanii* sp. nov., isolated from faeces of yaks (*Bos grunniens*). *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 5216-5221.

**Johnston, L. M. a Jaykus, L. A. (2004).** Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl Environ Microbiol* 70, 3133-3137.

**Johnston, L. M., Jaykus, L. A., Moll, D., Anciso, J., Mora, B. a Moe, C. L. (2006).** A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int J Food Microbiol* 112, 83-95.

**Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F. a Chassard, C. (2014).** Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol* 16, 2891-2904.

**Jung, A., Metzner, M. a Ryll, M. (2017).** Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. *BMC Microbiol* 17, 33.

**Jung, A., Chen, L. R., Suyemoto, M. M., Barnes, H. J. a Borst, L. B. (2018).** A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. *Avian Dis* 62, 261-271.

**Jung, S. a Regan, J. M. (2007).** Comparison of anode bacterial communities and performance in microbial fuel cells with different electron donors. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 393-402.

**Jurkovic, D., Krizkova, L., Dusinsky, R., Belicova, A., Sojka, M., Krajcovic, J. a Ebringer, L. (2006a).** Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett Appl Microbiol* 42, 553-559.

**Jurkovic, D., Krizkova, L., Sojka, M., Belicova, A., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P. a Vancanneyt, M. (2006b).** Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *J Gen Appl Microbiol* 52, 329-337.

**Justé, A., Lievens, B., Rediers, H. a Willems, K. A. (2014).** The genus *Tetragenococcus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 213-227. Editor W. H. Holzapel a B. J. B. Wood. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

**Kadri, Z., Spitaels, F., Cnockaert, M., Praet, J., El Farricha, O., Swings, J. a Vandamme, P. (2015).** *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Anton Leeuw Int J G* 108, 1257-1265.

**Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C. a Cogan, T. M. (2007).** Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J Appl Microbiol* 103, 1393-1405.

**Kalina, A. P. (1970).** The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Syst Bacteriol* 20, 185-189.

**Kämpfer, P. (2012).** Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Anton Leeuw Int J G* 101, 3-11.

**Kämpfer, P. (2014).** Continuing importance of the “phenotype” in the genomic era. *Methods in Microbiology, Volume 41, New Approaches to Prokaryotic Systematics*, str. 307-320. Editor M. Goodfellow, I. Sutcliffe a J. Chun. Academic Press.

**Kaufhold, A. a Ferrieri, P. (1991).** Isolation of *Enterococcus mundtii* from normally sterile body sites in two patients. *J Clin Microbiol* 29, 1075-1077.

**Ke, D., Picard, F. J., Martineau, F., Menard, C., Roy, P. H., Ouellette, M. a Bergeron, M. G. (1999).** Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 37, 3497-3503.

**Khan, H., Flint, S. a Yu, P.-L. (2010).** Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol* 141, 1-10.

**Kim, J. Y., Shin, N.-R., Na, H.-K., Hyun, D.-W., Whon, T. W., Kim, P. S., Yun, J.-H. a Bae, J.-W. (2013).** *Enterococcus diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena coreana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4540-4545.

**Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L.-P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S. M., Allouch, P., Mainfait, M., Puppels, G. J. a Naumann, D. (2001).** Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol* 39, 1763-1770.

**Knudtson, L. M. a Hartman, P. A. (1993).** Enterococci in pork processing. *J Food Prot* 56, 6-9.

**Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Sukura, A. a Björkroth, J. (2004).** *Enterococcus hermanniensis* sp nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1823-1827.

**Koskey, A. M., Fisher, J. C., Traudt, M. F., Newton, R. J. a McLellan, S. L. (2014).** Analysis of the gull fecal microbial community reveals the dominance of *Catelicoccus marimammalium* in relation to culturable enterococci. *Appl Environ Microbiol* 80, 757-765.

**Kozyreva, V. K., Truong, C. L., Greninger, A. L., Crandall, J., Mukhopadhyay, R. a Chaturvedi, V. (2017).** Validation and implementation of clinical laboratory improvements act-compliant whole-genome sequencing in the public health microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 55, 2502-2520.

**Kubašová, I., Strompfová, V. a Lauková, A. (2017).** Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol* 62, 491-498.

**Kubota, N., Kuzumoto, K., Hidaka, E., Yoshizawa, K., Yumoto, K., Oana, K., Ogiso, Y., Nakamura, T. a Kawakami, Y. (2013).** First isolation of oleate-dependent *Enterococcus faecalis* small-colony variants from the umbilical exudate of a paediatric patient with omphalitis. *J Med Microbiol* 62, 1883-1890.

**KuKanich, K. S. a Lubbers, B. V. (2015).** Review of enterococci isolated from canine and feline urine specimens from 2006 to 2011. *J Am Anim Hosp Assoc* 51, 148-154.

**Kumar, S., Stecher, G. a Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.

**Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. a Fryer, J. L. (1991).** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 41, 406-409.

**Lacoux, P. A., Jordens, J. Z., Fenton, C. M., Guiney, M. a Pennington, T. H. (1992).** Characterization of enterococcal isolates by restriction enzyme analysis of genomic DNA. *Epidemiol Infect* 109, 69-80.

**Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D. M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., Moore, R. J., Ballard, S., Grayson, M. L., Johnson, P. D. R., Howden, B. P. a Stinear, T. P. (2012).** Comparative analysis of the first complete *Enterococcus faecium* genome. *J Bacteriol* 194, 2334-2341.

**Lancefield, R. C. (1933).** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57, 571-595.

**Lang, M. M., Ingham, S. C. a Ingham, B. H. (2001).** Differentiation of *Enterococcus* spp. by cell membrane fatty acid methyl ester profiling, biotyping and ribotyping. *Lett Appl Microbiol* 33, 65-70.

**Lauer, A. C., Humrighouse, B. W., Loparev, V., Shewmaker, P. L., Whitney, A. M., McQuiston, J. R. a McLaughlin, R. W. (2016).** Complete genome sequences of *Enterococcus rotai* LMG 26678<sup>T</sup> and *Enterococcus silesiacus* LMG 23085<sup>T</sup>. *Genome Announc* 4, e01387-16.

- Laukova, A. a Juris, P. (1997).** Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. *Microbios* 89, 73-80.
- Lauková, A., Simonová, M., Stropfová, V., Styriak, I., Ouwehand, A. C. a Várady, M. (2008).** Potential of enterococci isolated from horses. *Anaerobe* 14, 234-236.
- Law-Brown, J. a Meyers, P. R. (2003).** *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 683-685.
- Lawson, P. A., Collins, M. D., Falsen, E. a Foster, G. (2006).** *Catelicoccus marimammalium* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium from porpoise and grey seal. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 429-432.
- Lawson, P. A. (2014).** The genus *Vagococcus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 229-237. Editor W. H. Holzapel a B. J. B. Wood. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Layton, B. A., Walters, S. P., Lam, L. H. a Boehm, A. B. (2010).** *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J Appl Microbiol* 109, 539-547.
- Leblanc, J. D. (2006).** *Enterococcus*. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* Third Edition Volume 4: *Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, str. 175-204. Editor M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer a E. Stackebrandt. New York, USA: Springer.
- Lebreton, F., Manson, A. L., Saavedra, J. T., Straub, T. J., Earl, A. M. a Gilmore, M. S. (2017).** Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. *Cell* 169, 849-861.e13.
- Ledina, T., Golob, M., Djordjevic, J., Magas, V., Colovic, S. a Bulajic, S. (2018).** MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of Serbian artisanal cheeses microbiota. *J Consum Prot Food Saf* 13, 309-314.
- Lee, J. a Deininger, R. A. (2004).** Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence* 19, 31-36.
- Lee, M., Chung, H.-S., Moon, H.-W., Lee, S. H. a Lee, K. (2015).** Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems, Vitek MS and Microflex LT, for the identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories. *J Microbiol Meth* 113, 13-15.
- Lehner, A., Loy, A., Behr, T., Gaenge, H., Ludwig, W., Wagner, M. a Schleifer, K. H. (2005).** Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 246, 133-142.
- Leon-Sampedro, R., del Campo, R., Rodriguez-Banos, M., Lanza, V. F., Pozuelo, M. J., Frances-Cuesta, C., Tedim, A. P., Freitas, A. R., Novais, C., Peixe, L., Willems, R. J. L., Corander, J., Candelas, F. G., Baquero, F. a Coque, T. M. (2019).** Phylogenomics of *Enterococcus faecalis* from wild birds: new insights into host-associated differences in core and accessory genomes of the species. *Environ Microbiol* 21, 3046-3062.
- Li, C. Y., Tian, F., Zhao, Y. D. a Gu, C. T. (2014).** *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1012-1017.
- Li, Y. Q. a Gu, C. T. (v tisku).** *Enterococcus pingfangensis* sp. nov., *Enterococcus dongliensis* sp. nov., *Enterococcus hulanensis* sp. nov., *Enterococcus nangangensis* sp. nov. and *Enterococcus songbeiensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle juice. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Linaje, R., Coloma, M. D., Perez-Martinez, G. a Zuniga, M. (2004).** Characterization of faecal enterococci from rabbits for the selection of probiotic strains. *J Appl Microbiol* 96, 761-771.
- Lopes, M. D. S., Simoes, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F. a Crespo, M. T. B. (2006).** Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 112, 208-214.
- Lopez-Canovas, L., Benitez, M. B. M., Isidron, J. A. H. a Soto, E. F. (2019).** Pulsed field gel electrophoresis: past, present, and future. *Anal Biochem* 573, 17-29.
- Lu, J. R., Santo Domingo, J. W., Lamendella, R., Edge, T. a Hill, S. (2008).** Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Appl Environ Microbiol* 74, 3969-3976.
- Lucena-Padrós, H., González, J. M., Caballero-Guerrero, B., Ruiz-Barba, J. L. a Maldonado-Barragán, A. (2014).** *Enterococcus olivae* sp. nov., isolated from Spanish-style green-olive fermentations. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2534-2539.

**Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Kurlenda, J. a Olanczuk-Neyman, K. (2010).** Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Sci Technol* 62, 466-473.

**Ludwig, W., Schleifer, K. H. a Whitman, W. B. (2009).** Family IV. *Enterococcaceae* fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes*, str. 594. Editor P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer a W. B. Whitman. New York, USA: Springer.

**Luiz, L. M. P., Castro, R. D., Sandes, S. H. C., Silva, J. G., Oliveira, L. G., Sales, G. A., Nunes, A. C. a Souza, M. R. (2017).** Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA-J Food* 15, 125-128.

**Lupski, J. R. a Weinstock, G. M. (1992).** Short, interspersed repetitive DNA-sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 174, 4525-4529.

**Lyons, C., Raustad, N., Bustos, M. A. a Shiaris, M. (2015).** Incidence of type II CRISPR1-Cas systems in *Enterococcus* is species-dependent. *PLoS ONE* 10, e0143544.

**Macovei, L. a Zurek, L. (2006).** Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl Environ Microbiol* 72, 4028-4035.

**Magni, C., Espeche, C., Repizo, G. D., Saavedra, L., Suárez, C. A., Blancato, V. S., Espariz, M., Esteban, L., Raya, R. R., Font de Valdez, G., Vignolo, G., Mozzi, F., Taranto, M. P., Hebert, E. M., Nader-Macías, M. E. a Sesma, F. (2012).** Draft genome sequence of *Enterococcus mundtii* CRL1656. *J Bacteriol* 194, 550.

**Mallon, D. J. P., Corkill, J. E., Hazel, S. M., Wilson, J. S., French, N. P., Bennett, M. a Hart, C. A. (2002).** Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild mammals. *Emerg Inf Dis* 8, 636-638.

**Manero, A. a Blanch, A. R. (1999).** Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 65, 4425-4430.

**Maraccini, P. A., Ferguson, D. M. a Boehm, A. B. (2012).** Diurnal variation in *Enterococcus* species composition in polluted ocean water and a potential role for the enterococcal carotenoid in protection against photoinactivation. *Appl Environ Microbiol* 78, 305-310.

**Marogna, G., Rolesu, S., Lollai, S., Tola, S. a Leori, G. (2010).** Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Res* 88, 119-125.

**Marrow, J., Whittington, J. K., Mitchell, M., Hoyer, L. L. a Maddox, C. (2009).** Prevalence and antibiotic-resistance characteristics of *Enterococcus* spp. isolated from free-living and captive raptors in central Illinois. *J Wildl Dis* 45, 302-313.

**Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M. a Martínez-Bueno, M. (2009).** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol* 132, 24-32.

**Martín, B., Corominas, L., Garriga, M. a Aymerich, T. (2009).** Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *J Appl Microbiol* 106, 66-77.

**Martin, J. D. a Mundt, J. O. (1972).** Enterococci in insects. *Appl Microbiol* 24, 575-580.

**Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L. a Rodríguez, J. M. (2003).** Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143, 754-758.

**Martinez-Murcia, A. J. a Collins, M. D. (1991).** *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 80, 69-73.

**Mathijs, E., Vandenbussche, F. a Van Borm, S. (2016).** Using genomics for surveillance of veterinary infectious agents. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 35, 143-157.

**Maugeri, T. L., Carbone, M., Fera, M. T., Irrera, G. P. a Gugliandolo, C. (2004).** Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *J Appl Microbiol* 97, 354-361.

**Mbogning Fonkou, M. D., Bilen, M., Gouba, N., Khelaifia, S., Cadoret, F., Nguyen, T. T., Richez, M., Bittar, F., Fournier, P. E., Raoult, D. a Dubourg, G. (2019).** Non-contiguous finished genome sequencing and description of *Enterococcus timonensis* sp. nov. isolated from human sputum. *New Microbes New Infect* 29, 100532.

**McGowan, L. L., Jackson, C. R., Barrett, J. B., Hiott, L. M. a Fedorca-Cray, P. J. (2006).** Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot* 69, 2976-2982.

**McLaughlin, R. W., Shewmaker, P. L., Whitney, A. M., Humrighouse, B. W., Lauer, A. C., Loparev, V. N., Gulvik, C. A., Cochran, P. A. a Dowd, S. E. (2017).** *Enterococcus crotali* sp. nov., isolated from faecal material of a timber rattlesnake. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1984-1989.

**Medrek, T. F. a Litsky, W. (1960).** Comparative incidence of coliform bacteria and enterococci in undisturbed soil. *Appl Microbiol* 8, 60-63.

**Merkel, L. K., Lulich, J., Polzin, D., Ober, C., Westropp, J. a Sykes, J. (2017).** Clinicopathologic and microbiologic findings associated with emphysematous cystitis in 27 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 53, 313-320.

**Merquior, V. L. C., Peralta, J. M., Facklam, R. R. a Teixeira, L. M. (1994).** Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. *Curr Microbiol* 28, 149-153.

**Mobley, H. L. a Hausinger, R. P. (1989).** Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev* 53, 85-108.

**Moll, G. N., Konings, W. N. a Driessen, A. J. M. (1999).** Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Anton Leeuw Int J G* 76, 185-198.

**Montgomery, J., Gillespie, D., Sastrawan, P., Fredeking, T. a Stewart, G. (2002).** Aerobic salivary bacteria in wild and captive Komodo dragons. *J Wildl Dis* 38, 545-551.

**Moore, D. F., Guzman, J. A. a McGee, C. (2008).** Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *J Appl Microbiol* 105, 1017-1025.

**Morandi, S., Cremonesi, P., Povolò, M. a Brasca, M. (2012).** *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1992-1996.

**Moyaert, H., De Graef, E. M., Haesebrouck, F. a Decostere, A. (2006).** Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. *Res Vet Sci* 81, 1-7.

**Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. a Pardesi, K. R. (2019).** Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front Microbiol* 10, 539.

**Müller, T., Ulrich, A., Ott, E. M. a Müller, M. (2001).** Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol* 91, 268-278.

**Mundt, J. O. (1961).** Occurrence of enterococci: bud, blossom, and soil studies. *Appl Microbiol* 9, 541-544.

**Mundt, J. O., Coggin, J. H. a Johnson, L. F. (1962).** Growth of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* on plants. *Appl Microbiol* 10, 552-555.

**Mundt, J. O. (1963a).** Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol* 11, 141-144.

**Mundt, J. O. (1963b).** Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Appl Microbiol* 11, 136-140.

**Mundt, J. O. (1975).** Unidentified streptococci from plants. *Int J Syst Bacteriol* 25, 281-285.

**Mundt, J. O. (1976).** Streptococci in dried and frozen foods. *J Milk Food Technol* 39, 413-416.

**Mundt, J. O. (1986).** Enterococci. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, str. 1063-1065. Editor P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe a J. G. Holt. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.

**Murray, P. R. (2010).** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 16, 1626-1630.

**Murrell, A., Dobson, S. J., Yang, X. Y., Lacey, E. a Barker, S. C. (2003).** A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. *Parasitol Res* 89, 326-334.

**Mylyona, E., Vadala, C., Papastamopoulos, V. a Skoutelis, A. (2012).** Brain abscess caused by *Enterococcus faecalis* following a dental procedure in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Microbiol* 50, 1807-1809.

**Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D. a Flahaut, C. (2017).** MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. *Int J Food Microbiol* 247, 2-8.

**Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Kawashima, K., Nagata, S., Nomoto, K. a Yamashiro, Y. (2016).** Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy term infants born vaginally or by cesarean section. *Front Microbiol* 7, 1997.

**Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S. a Yamashiro, Y. (2017).** Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: a quantitative bird's-eye view. *Front Microbiol* 8, 1388.

**Nami, Y., Haghshenas, B. a Khosroushahi, A. Y. (2018).** Molecular identification and probiotic potential characterization of lactic acid bacteria isolated from human vaginal microbiota. *Adv Pharm Bull* 8, 683-695.

**Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S. a Hejazi, M. A. (2019).** Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Front Microbiol* 10, 300.

**Naser, S., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Thompson, C. C., Vancanneyt, M. a Swings, J. (2005a).** Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* 43, 2224-2230.

**Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. a Swings, J. (2005b).** Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiol* 151, 2141-2150.

**Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Švec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F. a Swings, J. (2005c).** *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2177-2182.

**Naser, S. M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K. a Swings, J. (2006).** Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 413-416.

**Naser, S. M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M. a Swings, J. (2007).** Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2777-2789.

**Nayak, B. S., Badgley, B. a Harwood, V. J. (2011).** Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. *Appl Environ Microbiol* 77, 5050-5055.

**Neely, A. N. a Maley, M. P. (2000).** Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J Clin Microbiol* 38, 724-726.

**Niemi, R. M., Niemela, S. I., Bamford, D. H., Hantula, J., Hyvarinen, T., Forsten, T. a Raateland, A. (1993).** Presumptive fecal streptococci in environmental samples characterized by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 59, 2190-2196.

**Niemi, R. M., Ollinkangas, T., Paulin, L., Švec, P., Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M. a Lindström, K. (2012).** *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 2169-2173.

**Nieto, J. M., Devesa, S., Quiroga, I. a Toranzo, A. E. (1995).** Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J Fish Dis* 18, 21-30.

**Noble, W. C., Virani, Z. a Cree, R. G. A. (1992).** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 93, 195-198.

**Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C. a Pedersen, K. (2019).** Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Dairy Sci* 102, 2515-2524.

**Ogier, J.-C. a Serror, P. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 126, 291-301.

**Ogihara, S., Saito, R., Sawabe, E., Hagihara, M. a Tohda, S. (2016).** First Japanese case of infectious endocarditis due to *Enterococcus faecalis* small-colony variants. *J Infect Chemother* 22, 716-719.

Oliveira, M., Tavares, M., Gomes, D., Touret, T., Braz, B. S., Tavares, L. a Semedo-Lemsaddek, T. (2016). Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 46, 27-31.

Olsen, R. H., Schonheyder, H. C., Christensen, H. a Bisgaard, M. (2012). *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoonoses Public Hlth* 59, 256-263.

Olstorpe, M., Schnürer, J. a Passoth, V. (2010). Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under Swedish farm conditions. *Anim Feed Sci Technol* 156, 37-46.

Oravcova, V., Zurek, L., Townsend, A., Clark, A. B., Ellis, J. C., Cizek, A. a Literak, I. (2014). American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene. *Environ Microbiol* 16, 939-949.

Oravcova, V., Svec, P. a Literak, I. (2017). Vancomycin-resistant enterococci with *vanA* and *vanB* genes in Australian gulls. *Environ Microbiol Rep* 9, 316-318.

Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Casquete, R., Serradilla, M. J. a de Guía Córdoba, M. (2013). Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter. *Food Control* 33, 448-454.

Orla-Jensen, S. (1919). The lactic acid bacteria. *Mem Acad Roy Sci Danemark, Sect Sci Ser 8* 5, 81-197.

Ortigosa, M., Irigoyen, A., Urdin, M., Garcia, S., Ibanez, F. C. a Torre, P. (2008). Identification of enterococci and isolation of vancomycin-resistant strains in Spanish cheeses. *Milchwiss-Milk Sci Int* 63, 164-167.

Ott, E. M., Müller, T., Müller, M., Franz, C. M. A. P., Ulrich, A., Gabel, M. a Seyfarth, W. (2001). Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J Appl Microbiol* 91, 54-66.

Ozawa, Y., Courvalin, P. a Galimand, M. (2000). Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligases. *Syst Appl Microbiol* 23, 230-237.

Panda, S. K., Padhi, L. a Sahoo, G. (2018). Oral bacterial flora of Indian cobra (*Naja naja*) and their antibiotic susceptibilities. *Heliyon* 4, e01008.

Pangallo, D., Drahovska, H., Harichova, J., Karellova, E., Chovanova, K., Aradska, J., Ferienc, P., Turna, J. a Timko, J. (2008). Evaluation of different PCR-based approaches for the identification and typing of environmental enterococci. *Anton Leeuw Int J G* 93, 193-203.

Paramithiotis, S., Kagkli, D. M., Blana, V. A., Nychas, G. J. E. a Drosinos, E. H. (2008). Identification and characterization of *Enterococcus* spp. in Greek spontaneous sausage fermentation. *J Food Prot* 71, 1244-1247.

Parte, A. C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 42, D613-D616.

Pasteris, S., Vera Pingitore, E., Roig Babot, G., Otero, M., Bühler, M. a Nader-Macías, M. (2009). Characterization of the beneficial properties of lactobacilli isolated from bullfrog (*Rana catesbeiana*) hatchery. *Anton Leeuw Int J G* 95, 373-385.

Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., Fouts, D. E., Eisen, J. A., Gill, S. R., Heidelberg, J. F., Tettelin, H., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R. T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K. A., Dougherty, B. A. a Fraser, C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.

Pendleton, J. N., Gorman, S. P. a Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 11, 297-308.

Perkowski, K., Baltazaz, W., Conn, D. B., Marczyńska-Stolarek, M. a Chomicz, L. (2019). Examination of oral biofilm microbiota in patients using fixed orthodontic appliances in order to prevent risk factors for health complications. *Ann Agr Env Med* 26, 231-235.

Petersen, A., Chadfield, M. S., Christensen, J. P., Christensen, H. a Bisgaard, M. (2008). Characterization of small-colony variants of *Enterococcus faecalis* isolated from chickens with amyloid arthropathy. *J Clin Microbiol* 46, 2686-2691.

**Petersen, A., Christensen, H., Philipp, H.-C. a Bisgaard, M. (2009).** Clonality of *Enterococcus faecalis* associated with amyloid arthropathy in chickens evaluated by multilocus sequence typing (MLST). *Vet Microbiol* 134, 392-395.

**Pillay, S., Zishiri, O. T. a Adeleke, M. A. (2018).** Prevalence of virulence genes in *Enterococcus* species isolated from companion animals and livestock. *Onderstepoort J Vet Res* 85, e1-e8.

**Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G. a Reali, D. (1999).** Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett Appl Microbiol* 29, 258-263.

**Pogue, J. M., Kaye, K. S., Cohen, D. A. a Marchaim, D. (2015).** Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clin Microbiol Infect* 21, 302-312.

**Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M. C., Ingianni, A., Cortis, G. a Dainelli, B. (1992).** *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int J Syst Bacteriol* 42, 365-369.

**Pourcher, A. M., Devriese, L. A., Hernandez, J. F. a Delattre, J. M. (1991).** Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of fecal pollution of waters. *J Appl Bacteriol* 70, 525-530.

**Poyart, C., Quesnes, G. a Trieu-Cuot, P. (2000).** Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 38, 415-418.

**Pressel, M. A., Fox, L. E., Apley, M. D. a Simutis, F. J. (2005).** Vancomycin for multi-drug resistant *Enterococcus faecium* cholangiohepatitis in a cat. *J Feline Med Surg* 7, 317-321.

**Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. a Peters, G. (2006).** Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4, 295-305.

**Puchter, L., Chaberny, I. F., Schwab, F., Vonberg, R.-P., Bange, F.-C. a Ebadi, E. (2018).** Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Resist Infect Control* 7, 1.

**Qin, X., Galloway-Pena, J., Sillanpaa, J., Roh, J., Nallapareddy, S., Chowdhury, S., Bourgogne, A., Choudhury, T., Muzny, D., Buhay, C., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Liu, W., Kovar, C., Sodergren, E., Highlander, S., Petrosino, J., Worley, K., Gibbs, R., Weinstock, G. a Murray, B. (2012).** Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiol* 12, 135.

**Quednau, M., Ahrne, S., Petersson, A. C. a Molin, G. (1998).** Identification of clinically important species of *Enterococcus* within 1 day with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Curr Microbiol* 36, 332-336.

**Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. a Cotter, P. D. (2013).** The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37, 664-698.

**Quintelas, C., Ferreira, E. C., Lopes, J. A. a Sousa, C. (2018).** An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing. *Biotechnol J* 13, 1700449.

**Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Sargo, R., Araújo, C., López, M., Torres, C., Igrejas, G. a Poeta, P. (2010).** MLST and a genetic study of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing *Enterococcus* from buzzards (*Buteo buteo*). *Lett Appl Microbiol* 50, 537-541.

**Radhouani, H., Poeta, P., Goncalves, A., Pacheco, R., Sargo, R. a Igrejas, G. (2012).** Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *J Med Microbiol* 61, 837-843.

**Radhouani, H., Igrejas, G., Goncalves, A., Pacheco, R., Monteiro, R., Sargo, R., Brito, F., Torres, C. a Poeta, P. (2013).** Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and enterococci from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe* 23, 82-86.

**Radiměřský, T., Frolková, P., Janoszowská, D., Dolejská, M., Švec, P., Roubalová, E., Ciková, P., Čížek, A. a Literák, I. (2010).** Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *J Appl Microbiol* 109, 1687-1695.

**Rahkila, R., Johansson, P., Sade, E. a Bjorkroth, J. (2011).** Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 77, 1196-1203.



**Rajilić-Stojanović, M. a de Vos, W. M. (2014).** The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38, 996-1047.

**Rana, S. W., Kumar, A., Walia, S. K., Berven, K. a Cumper, K. (2011).** Isolation of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from wood frogs: an emerging risk for zoonotic bacterial infections to humans. *J Appl Microbiol* 110, 35-43.

**Rantsiou, K., Kathariou, S., Winkler, A., Skandamis, P., Saint-Cyr, M. J., Rouzeau-Szynalski, K. a Amezcua, A. (2018).** Next generation microbiological risk assessment: opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *Int J Food Microbiol* 287, 3-9.

**Raven, K. E., Gouliouris, T., Brodrick, H., Coll, F., Brown, N. M., Reynolds, R., Reuter, S., Torok, M. E., Parkhill, J. a Peacock, S. J. (2017).** Complex routes of nosocomial vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmission revealed by genome sequencing. *Clin Inf Dis* 64, 886-893.

**Reis, N. A., Saraiva, M. A. F., Duarte, E. A. A., de Carvalho, E. A., Vieira, B. B. a Evangelista-Barreto, N. S. (2016).** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J Appl Microbiol* 121, 811-820.

**Renner, P. a Peters, J. (1999).** Resistance of enterococci to heat and chemical agents. *Zentbl Hyg Umweltmed* 202, 41-50.

**Reuter, S., Ellington, M. J., Cartwright, E. J. P., Koser, C. U., Torok, M. E., Gouliouris, T., Harris, S. R., Brown, N. M., Holden, M. T. G., Quail, M., Parkhill, J., Smith, G. P., Bentley, S. D. a Peacock, S. J. (2013).** Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern Med* 173, 1397-1404.

**Rice, L. B. (2008).** Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 197, 1079-1081.

**Ringo, E. a Gatesoupe, F. J. (1998).** Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177-203.

**Rishi, E., Rishi, P., Nandi, K., Shroff, D. a Therese, K. L. (2009).** Endophthalmitis caused by *Enterococcus faecalis*: a case series. *Retin-J Retin Vitro Dis* 29, 214-217.

**Robbins, R. J., Krishtalka, L. a Wooley, J. C. (2016).** Advances in biodiversity: metagenomics and the unveiling of biological dark matter. *Stand Genomic Sci* 11, 69.

**Rodrigues, U. a Collins, M. D. (1990).** Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 71, 231-234.

**Rodríguez, J. M. (2014).** The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 5, 779-784.

**Romalde, J. L., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J. L. a Toranzo, A. E. (1996).** Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl Environ Microbiol* 62, 607-611.

**Ruiz, L., Bacigalupe, R., Garcia-Carral, C., Boix-Amoros, A., Arguello, H., Silva, C. B., Checa, M. D., Mira, A. a Rodriguez, J. M. (2019).** Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci Rep* 9, 8435.

**Ruoff, K. L., Delamaza, L., Murtagh, M. J., Spargo, J. D. a Ferraro, M. J. (1990).** Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 28, 435-437.

**Ryzhov, V. a Fenselau, C. (2001).** Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 73, 746-750.

**Saitou, N. a Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

**Samelis, J., Bleicher, A., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Neuhaus, K. a Montel, M.-C. (2011).** FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiol* 28, 76-83.

**Sanderson, H., Ortega-Polo, R., McDermott, K., Zaheer, R., Brown, R. S., Majury, A., McAllister, T. a Liss, S. N. (2019).** Comparison of biochemical and genotypic speciation methods for vancomycin-resistant enterococci isolated from urban wastewater treatment plants. *J Microbiol Meth* 161, 102-110.

**Sandoe, J. A. T., Witherden, I. R. a Settle, C. (2001).** Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. *J Clin Microbiol* 39, 1678-1679.

**Sandt, C., Madoulet, C., Kohler, A., Allouch, P., De Champs, C., Manfait, M. a Sockalingum, G. D. (2006).** FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *J Appl Microbiol* 101, 785-797.

**Sango, A., McCarter, Y. S., Johnson, D., Ferreira, J., Guzman, N. a Jankowski, C. A. (2013).** Stewardship approach for optimizing antimicrobial therapy through use of a rapid microarray assay on blood cultures positive for *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 51, 4008-4011.

**Sánchez-Herrera, K., Sandoval, H., Mouniee, D., Ramírez-Durán, N., Bergeron, E., Boiron, P., Sánchez-Saucedo, N. a Rodríguez-Nava, V. (2017).** Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene. *New Microbes New Infect* 19, 96-116.

**Santagati, M., Campanile, F. a Stefani, S. (2012).** Genomic diversification of enterococci in hosts: the role of the mobilome. *Front Microbiol* 14, 95.

**Santos, T., Capelo, J. L., Santos, H. M., Oliveira, I., Marinho, C., Gonçalves, A., Araújo, J. E., Poeta, P. a Igrejas, G. (2015).** Use of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting to characterize *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. *J Proteomics* 127, 321-331.

**Savas, S., Hazirolan, G., Karagoz, A. a Parlak, M. (2019).** From days to hours: can MALDI-TOF MS system replace both conventional and molecular typing methods with new cut off level for vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Meth* 162, 62-68.

**Savini, V., Manna, A., D'Antonio, F., Talia, M., Catavittello, C., Balbinot, A., Febbo, F., Carlino, D., Fioritoni, F., Di Bonaventura, G. a D'Antonio, D. (2008).** First report of vaginal infection caused by *Enterococcus raffinosus*. *J Med Microbiol* 57, 672-673.

**Sedláček, I., Holochová, P., Mašláňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z. a Švec, P. (2013).** *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 502-510.

**Semedo-Lemsaddek, T., Nóbrega, C. S., Ribeiro, T., Pedroso, N. M., Sales-Luís, T., Lemsaddek, A., Tenreiro, R., Tavares, L., Vilela, C. L. a Oliveira, M. (2013).** Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Vet Microbiol* 163, 378-382.

**Sender, R., Fuchs, S. a Milo, R. (2016).** Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology* 14, e1002533.

**Sendi, P. a Proctor, R. A. (2009).** *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* 17, 54-58.

**Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S. a Batra, N. (2018).** Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol* 4, 42-66.

**Sherman, J. M. (1937).** The streptococci. *Bacteriol Rev* 1, 3-97.

**Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Nicholson, A. C., Carvalho, M. d. G. S., Facklam, R. R., Whitney, A. M. a Teixeira, L. M. (2011).** Reevaluation of the taxonomic status of recently described species of *Enterococcus*: evidence that *E. thailandicus* is a senior subjective synonym of "*E. sanguinicola*" and confirmation of *E. caccae* as a species distinct from *E. silesiacus*. *J Clin Microbiol* 49, 2676-2679.

**Schleifer, K. H. a Kilpper-Bälz, R. (1984).** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 34, 31-34.

**Schmidt, V. S. J., Mayr, R., Wenning, M., Glockner, J., Busse, H.-J. a Scherer, S. (2009).** *Bavariococcus seileri* gen. nov., sp. nov., isolated from the surface and smear water of German red smear soft cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2437-2443.

**Schouten, M. A., Hoogkamp-Korstanje, J. A. A., Meis, J. F. G. a Voss, A. (2000).** Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 816-822.

**Schumann, P. a Pukall, R. (2013).** The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Syst Appl Microbiol* 36, 369-375.

**Signoretto, C., Burlacchini, G., Lleo, M. D., Pruzzo, C., Zampini, M., Pane, L., Franzini, G. a Canepari, P. (2004).** 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* 70, 6892-6896.

**Simonetta, A. C., deVelasco, L. G. M. a Frison, L. N. (1997).** Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett Appl Microbiol* 24, 139-143.

**Sistek, V., Maheux, A. F., Boissinot, M., Bernard, K. A., Cantin, P., Cleenwerck, I., De Vos, P. a Bergeron, M. G. (2012).** *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1314-1320.

**Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, M. S., Mohan, M., Venkatesan, T. a Verghese, A. (2016).** Diversity of culturable gut bacteria associated with the field populations of cotton leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) in India. *Indian J Agric Sci* 86, 208-215.

**Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, M. S., Mohan, M., Venkatesan, T., Ballal, C. R., Ramanujam, B., Yalashetti, S., Kumari, S. a Verghese, A. (2017).** Characterization and role of gut bacterium *Bacillus pumilus* on nutrition and defense of leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) of cotton. *Indian J Agric Sci* 87, 534-539.

**Skerman, V. B. D., McGowan, V. a Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30, 225-420.

**Soler, J. J., Martin-Vivaldi, M., Ruiz-Rodriguez, M., Valdivia, E., Martin-Platero, A. M., Martinez-Bueno, M., Peralta-Sanchez, J. M. a Mendez, M. (2008).** Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Funct Ecol* 22, 864-871.

**Solheim, M., Aakra, A., Snipen, L., Brede, D. a Nes, I. (2009).** Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics* 10, 194.

**Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A. a Gueimonde, M. (2010).** Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16, 307-310.

**Soontornvipart, K., Kohout, P. a Proks, P. (2003).** Septic arthritis in dogs: a retrospective study of 20 cases (2000-2002). *Acta Vet Brno* 72, 405-413.

**Stepien-Pysniak, D., Hauschild, T., Rozanski, P. a Marek, A. (2017).** MALDI-TOF mass spectrometry as a useful tool for identification of *Enterococcus* spp. from wild birds and differentiation of closely related species. *J Microbiol Biotechnol* 27, 1128-1137.

**Stiles, M. E., Ramji, N. W., Ng, L. K. a Paradis, D. C. (1978).** Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organisms in meats. *Can J Microbiol* 24, 1502-1508.

**Stocker, M. D., Pachepsky, Y. A., Hill, R. L. a Shelton, D. R. (2015).** Depth-dependent survival of *Escherichia coli* and enterococci in soil after manure application and simulated rainfall. *Appl Environ Microbiol* 81, 4801-4808.

**Suárez, N. E., Saavedra, L., Složilová, I., Bonacina, J., Demnerová, K. a Sesma, F. (2013).** Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* strain CRL 1879, isolated from a northwestern Argentinian artisanal cheese. *Genome Announc* 1, e00514-13.

**Sukontasing, S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J.-S. a Suzuki, K.-I. (2007).** *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2151-2154.

**Sun, Y., Li, X., Wang, G., Wang, Y., Jiang, Y., Liu, Y., Yu, Z. a Qin, L. (2016).** Genome sequence of *Enterococcus pernyi*, a pathogenic bacterium for the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Genome Announc* 4, e01764-15.

**Šplíchalová, P., Švec, P., Ghosh, A., Zurek, L., Oravcová, V., Radiměšský, T., Bohuš, M. a Literák, I. (2015).** Prevalence, diversity and characterization of enterococci from three coraciiform birds. *Anton Leeuw Int J G* 107, 1281-1289.

**Švec, P. a Sedláček, I. (1999).** Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol* 44, 3-10.

**Švec, P., Devriese, L. A., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J. a Doškař, J. (2001a).** *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1567-1574.

Švec, P., Sedláček, I., Pantůček, R., Devriese, L. A. a Doškař, J. (2001b). Evaluation of ribotyping for characterization and identification of *Enterococcus haemoperoxidus* and *Enterococcus moraviensis* strains. *FEMS Microbiol Lett* 203, 23-27.

Švec, P., Devriese, L. A., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J. a Doškař, J. (2002). Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspersa*. *J Appl Microbiol* 92, 951-957.

Švec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. a Swings, J. (2005a). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2183-2187.

Švec, P., Vancanneyt, M., Koort, J., Naser, S. M., Hoste, B., Vihavainen, E., Vandamme, P., Swings, J. a Björkroth, J. (2005b). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2479-2484.

Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I. a Swings, J. (2005c). Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 247, 59-63.

Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. a Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 577-581.

Švec, P., Nováková, D., Žáčková, L., Kukletová, M. a Sedláček, I. (2008). Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. *Anton Leeuw Int J G* 94, 573-579.

Švec, P. a Sedláček, I. (2008). Characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from surface waters. *Folia Microbiol* 53, 53-56.

Švec, P. a Devriese, L. A. (2009). Genus I. *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud 1903) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, 32<sup>VP</sup>. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes*, str. 594-607. Editor P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer a W. B. Whitman. New York, USA: Springer.

Švec, P., Sedláček, I., Žáčková, L., Nováková, D. a Kukletová, M. (2009). *Lactobacillus* spp. associated with early childhood caries. *Folia Microbiol* 54, 53-58.

Švec, P., Pantůček, R., Petráš, P., Sedláček, I. a Nováková, D. (2010). Identification of *Staphylococcus* spp. using (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 33, 451-456.

Švec, P., Sedláček, I., Chrápavá, M. a Vandamme, P. (2011). (GTG)<sub>5</sub>-PCR fingerprinting of lactobacilli isolated from cervix of healthy women. *Folia Microbiol* 56, 80-83.

Švec, P., Vandamme, P., Bryndová, H., Holochová, P., Kosina, M., Mašlaňová, I. a Sedláček, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1499-1505.

Švec, P. a Franz, C. M. A. P. (2014a). The genus *Enterococcus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 175-211. Editor W. H. Holzapfel a B. J. B. Wood. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Švec, P. a Franz, C. M. A. P. (2014b). The family *Enterococcaceae*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, str. 171-173. Editor W. H. Holzapfel a B. J. B. Wood. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Švec, P., Bel, A. D., Sedláček, I., Petráš, P., Gelbíčová, T., Černošlávková, J., Mašlaňová, I., Cnockaert, M., Varbanovová, I., Echahidi, F., Vandamme, P. a Pantůček, R. (2015). *Staphylococcus petrasii* subsp. *pragensis* subsp. nov., occurring in human clinical material. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 2071-2077.

Švec, P., Petráš, P., Pantůček, R., Doškař, J. a Sedláček, I. (2016). High intraspecies heterogeneity within *Staphylococcus sciuri* and rejection of its classification into *S. sciuri* subsp. *sciuri*, *S. sciuri* subsp. *carnaticus* and *S. sciuri* subsp. *rodentium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 5181-5186.

Švec, P., Králová, S., Busse, H.-J., Kleinhagauer, T., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Cnockaert, M., Vandamme, P., Staňková, E., Gelbíčová, T., Holochová, P., Barták, M., Kýrová, K. a Sedláček, I. (2017). *Pedobacter jamesrossensis* sp. nov., *Pedobacter lithocola* sp. nov., *Pedobacter mendelii* sp. nov. and *Pedobacter petrophilus* sp. nov., isolated from the Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1499-1507.

Talarmin, J. P., Pineau, S., Guillouzouic, A., Boutoille, D., Giraudeau, C., Reynaud, A., Lepelletier, D. a Corvec, S. (2011). Relapse of *Enterococcus hirae* prosthetic valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 49, 1182-1184.

Tamborini, A., Jahns, H., McAllister, H., Kent, A., Harris, B., Procoli, F., Allenspach, K., Hall, E. J., Day, M. J., Watson, P. J. a O'Neill, E. J. (2016). Bacterial cholangitis, cholecystitis, or both in dogs. *J Vet Intern Med* 30, 1046-1055.

Tan, C.-K., Lai, C.-C., Wang, J.-Y., Lin, S.-H., Liao, C.-H., Huang, Y.-T., Wang, C.-Y., Lin, H.-I. a Hsueh, P.-R. (2010). Bacteremia caused by non-faecalis and non-faecium *enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. *J Infect* 61, 34-43.

Tan, S. C., Chong, C. W., Teh, C. S. J., Ooi, P. T. a Thong, K. L. (2018). Occurrence of virulent multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the pigs, farmers and farm environments in Malaysia. *PeerJ* 6, e5353.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S. a Lee, J.-S. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1630-1634.

Tang, X., Freitag, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., Cordero, E. A., Andersen, G., Westermann, M., Heckel, D. G. a Boland, W. (2012). Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS ONE* 7, e36978.

Taučer-Kapteijn, M., Hoogenboezem, W. a Medema, G. (2016). Environmental growth of the faecal indicator *Enterococcus moraviensis*. *Water Sci Technol-Water Supply* 16, 971-979.

Taučer-Kapteijn, M., Hoogenboezem, W., Hoogenboezem, R., de Haas, S. a Medema, G. (2017). Source tracking of *Enterococcus moraviensis* and *E. haemoperoxidus*. *J Water Health* 15, 41-49.

Taweerodjanakarn, S., Haertle, T., Chobert, J. M. a Hongpattarakere, T. (2019). Functional properties of *Enterococcus faecalis* isolated from colostrum drawn from Thai mothers. *Int Food Res J* 26, 141-151.

Techo, S., Shiwa, Y., Tanaka, N., Fujita, N., Miyashita, M., Shibata, C., Booncharoen, A. a Tanasupawat, S. (2019). *Enterococcus florum* sp. nov., isolated from a cotton flower (*Gossypium hirsutum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 69, 2506-2513.

Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Espinola, M. M. B., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J. a Facklam, R. R. (2001). *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1737-1743.

Teixeira, L. M., Siqueira Carvalho, M. d. G., Facklam, R. R. a Shewmaker, P. L. (2015). *Enterococcus. Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition, str. 403-421. Editor J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, K. C. Carroll, G. Funke, M. L. Landry, S. S. Richter a D. W. Warnock. Washington, DC., USA: ASM Press.

Theelen, M. J. P., Wilson, W. D., Edman, J. M., Magdesian, K. G. a Kass, P. H. (2014). Temporal trends in prevalence of bacteria isolated from foals with sepsis: 1979-2010. *Equine Vet J* 46, 169-173.

Thiercelin, M. E. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C R Séances Soc Biol* 50, 269-271.

Thiercelin, M. E. a Jouhaud, L. (1903). Reproduction de l'entérocoque: taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *C R Séances Soc Biol* 55, 686-688.

Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. a Niamsup, P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett* 31, 571-576.

Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Busse, H.-J., Ludwig, W. a Kampfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 249-266.

Top, J., Scholtes, M., Maquelin, K., Willems, R., Bonten, M., Wolfhagen, M., Hegge, R., Asbroek, M., Bruins, M. a Leverstein-van Hall, M. (2007). O105 Evaluation of a rapid test panel, the API Strep 20, the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments, and Raman spectroscopy for species identification of enterococci. *Int J Antimicrob Agents* 29, S22-S23.

Tsai, J.-C., Hsueh, P.-R., Lin, H.-M., Chang, H.-J., Ho, S.-W. a Teng, L.-J. (2005). Identification of clinically relevant *Enterococcus* species by direct sequencing of *groES* and spacer region. *J Clin Microbiol* 43, 235-241.

**Tsai, M. H., Liu, Y. Y. a Soo, V. W. (2017).** PathoBacTyper: a web server for pathogenic bacteria identification and molecular genotyping. *Front Microbiol* 8, 1474.

**Tsiodras, S., Gold, H. S., Coakley, E. P. G., Wennersten, C., Moellering, R. C., Jr. a Eliopoulos, G. M. (2000).** Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 38, 3991-3993.

**Turtura, G. C. a Lorenzelli, P. (1994).** Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res* 149, 203-213.

**Tyrrell, G. J., Bethune, R. N., Willey, B. a Low, D. E. (1997).** Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J Clin Microbiol* 35, 1054-1060.

**Tyrrell, G. J., Turnbull, L., Teixeira, L. M., Lefebvre, J., Carvalho, M. D. S., Facklam, R. R. a Lovgren, M. (2002).** *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 40, 1140-1145.

**Ulrich, A. a Müller, T. (1998).** Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J Appl Microbiol* 84, 293-303.

**Van Donsel, D. J., Geldreich, E. E. a Clarke, N. A. (1967).** Seasonal variations in survival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm-water pollution. *Appl Microbiol* 15, 1362-1370.

**van Schaik, W., Top, J., Riley, D., Boekhorst, J., Vrijenhoek, J., Schapendonk, C., Hendrickx, A., Nijman, I., Bonten, M., Tettelin, H. a Willems, R. (2010).** Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 11, 239.

**Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F. a Devriese, L. A. (2001).** *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 393-400.

**Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., Franz, C., Moreno, M. R. F., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F. a Holzapfel, W. H. (2002).** Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 68, 1381-1391.

**Vancanneyt, M., Zamfir, M., Devriese, L. A., Lefebvre, K., Engelbeen, K., Vandemeulebroecke, K., Amar, M., De Vuyst, L., Haesebrouck, F. a Swings, J. (2004).** *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2175-2179.

**Vasilopoulos, C., Ravyts, F., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L. a Leroy, F. (2008).** Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture-independent approaches. *J Appl Microbiol* 104, 1341-1353.

**Vermette, C., Russell, A., Desai, A. a Hill, J. (2010).** Resolution of phenotypically distinct strains of *Enterococcus* spp. in a complex microbial community using *cpn60* universal target sequencing. *Microb Ecol* 59, 14-24.

**Versalovic, J. a Lupski, J. R. (1999).** Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*, str. 38-48. Editor F. J. De Bruijn, J. R. Lupski a G. M. Weinstock. Norwell, USA: Kluwer Academic Publishers.

**Wambui, J., Tasara, T., Njage, P. M. K. a Stephan, R. (2018).** Species distribution and antimicrobial profiles of *Enterococcus* spp. isolates from Kenyan small and medium enterprise slaughterhouses. *J Food Prot* 81, 1445-1449.

**Wang, L. L., Qin, F., Song, C. a Zhou, Z. Y. (2010).** Reclassification of the pathogen for empty-gut disease of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Food Agric Environ* 8, 156-158.

**Weaver, K. E. (2006).** Enterococcal genetics. *Gram-Positive Pathogens*, Second Edition, str. 312-331. Editor V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy a J. I. Rood. Washington, DC, USA: ASM Press.

**Wei, L., Wu, Q., Zhang, J., Guo, W., Chen, M., Xue, L., Wang, J. a Ma, L. (2017).** Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China. *Front Microbiol* 8, 1109.

Wellinghausen, N., Chatterjee, I., Berger, A., Niederfuehr, A., Proctor, R. A. a Kahl, B. C. (2009). Characterization of clinical *Enterococcus faecalis* small-colony variants. *J Clin Microbiol* 47, 2802-2811.

Wenning, M., Büchl, N. R. a Scherer, S. (2010). Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J Biophoton* 3, 493-505.

Werner, G., Fleige, C., Feßler, A. T., Timke, M., Kostrzewa, M., Zischka, M., Peters, T., Kaspar, H. a Schwarz, S. (2012). Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Vet Microbiol* 160, 162-169.

Westgate, S. J., Percival, S. L., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D. a Cochrane, C. A. (2011). Microbiology of equine wounds and evidence of bacterial biofilms. *Vet Microbiol* 150, 152-159.

Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L. a Segars, W. I. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J Environ Qual* 31, 1286-1293.

Whitman, R. L., Shively, D. A., Pawlik, H., Nevers, M. B. a Byappanahalli, M. N. (2003). Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora* (Chlorophyta) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan *Appl Environ Microbiol* 69, 4714.

Whitman, W. B., Coleman, D. C. a Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6578-6583.

Willemsse-Erix, D., van Belkum, A. a Maquelin, K. (2011). Raman spectroscopy for bacterial strain typing. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, Second Edition, str. 313-324. Editor D. H. Persing, F. C. Tenover, Y. W. Tang, F. S. Nolte, R. T. Hayden a A. VanBelkum. Washington, DC, USA: ASM Press.

Williams, A. M., Farrow, J. A. E. a Collins, M. D. (1989). Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett Appl Microbiol* 8, 185-189.

Williams, A. M., Rodrigues, U. M. a Collins, M. D. (1991). Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res Microbiol* 142, 67-74.

Winston, L. G., Pang, S. K., Haller, B. L., Wong, M., Chambers, H. F. a Perdreau-Remington, F. (2004). API 20 Strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48, 287-288.

Wong, A. C. N., Chaston, J. M. a Douglas, A. E. (2013). The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *ISME J* 7, 1922-1932.

Xavier, D. B., Rosa, A. H., Sena, H. D., Teixeira, D. S., Tomaz, C. a Titze-de-Almeida, R. (2010). Absence of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in nonhuman primates. *Pesqui Vet Bras* 30, 491-496.

Yamahara, K. M., Walters, S. P. a Boehm, A. B. (2009). Growth of enterococci in unaltered, unseeded beach sands subjected to tidal wetting. *Appl Environ Microbiol* 75, 1517-1524.

Yong, H.-S., Song, S.-L., Chua, K.-O., Lim, P.-E. a Eamsobhana, P. (2019). Microbiota and potential opportunistic pathogens associated with male and female fruit flies of Malaysian *Bactrocera carambolae* (Insecta: Tephritidae). *Meta Gene* 19, 185-192.

You, I., Choi, S., Williams, T. R., Marco, M. L. a Kim, E. B. (2019). Draft genome sequence of *Enterococcus plantarum* strain TRW2, isolated from lettuce. *Microbiol Res Announc* 8, e01428-18.

Younge, N. E., Araujo-Perez, F., Brandon, D. a Seed, P. C. (2018). Early-life skin microbiota in hospitalized preterm and full-term infants. *Microbiome* 6, 98.

Yousif, N. M. K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H. A., Holzapfel, W. H. a 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.

Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D. a Giraffa, G. (2009). Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Syst Appl Microbiol* 32, 514-521.

Zaheer, R., Yanke, L. J., Church, D., Topp, E., Read, R. R. a McAllister, T. A. (2012). High-throughput species identification of enterococci using pyrosequencing. *J Microbiol Meth* 89, 174-178.

- Zehnder, M. a Guggenheim, B. (2009).** The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 42, 277-287.
- Zhang, L., Shi, K.-q. a Shi, G.-y. (2011).** Production of L-lactic acid with very high gravity distillery wastewater from ethanol fermentation by a newly isolated *Enterococcus hawaiiensis*. *J Chem Technol Biotechnol* 86, 213-216.
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, Y., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang, H. a Sun, Z. (2017).** Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol Res* 196, 95-105.
- Zimmer-Faust, A. G., Thulsiraj, V., Ferguson, D. a Jay, J. A. (2014).** Performance and specificity of the covalently linked immunomagnetic separation-ATP method for rapid detection and enumeration of enterococci in coastal environments. *Appl Environ Microbiol* 80, 2705-2714.
- Zischka, M., Kuenne, C., Blom, J., Dabrowski, P. W., Linke, B., Hain, T., Nitsche, A., Goesmann, A., Larsen, J., Jensen, L. B., Witte, W. a Werner, G. (2012).** Complete genome sequence of the porcine isolate *Enterococcus faecalis* D32. *J Bacteriol* 194, 5490-5491.