

The application of molecular biology techniques in the diagnosis of *Enterococcus cecorum* infections in chickens

Dolka B., Szeleszczuk P., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper aims at the presentation of molecular biology tests in poultry bacterial infections. In recent years the problems of infections caused by *Enterococcus cecorum* have been in the centre of poultry veterinarians attention. These microorganisms are part of the normal intestinal microflora in animals and humans and sometimes it may act as an opportunistic pathogen. Despite the low pathogenicity when compared with other bacteria, *E. cecorum* is considered as an important cause of economic losses in broiler chickens production. However, proper diagnosis of the problem is difficult both for veterinarians practicing in the field, as and in the laboratory. Actually the molecular biology techniques have increasing importance among diagnostic methods of *E. cecorum* infections.

Keywords: *Enterococcus cecorum*, EVOA, molecular biology techniques, chicken broilers.

Do niedawna zakażenia wywołane przez *Enterococcus cecorum* nie były notowane u drobiu, jednakże w ostatnich kilku latach coraz częściej ten gatunek bakterii jest przyczyną brakowań i upadków w chowie kurcząt (1, 2). Pierwsze przypadki klinicznych zakażeń wywołanych przez *E. cecorum* u drobiu opisano u brojlerów kurzych. Dane te pochodzą z 2002 r. ze Szkocji i z Holandii oraz z 2006 r. z Belgii (1, 3, 4). Jak wskazują najnowsze doniesienia *E. cecorum* jest czynnikiem etiologicznym enterokokowej choroby zwyrodnieniowej stawów kręgosłupa u kur (enterococcal vertebral osteoarthritis – EVOA). Pierwsze przypadki EVOA w USA odnotowano w 2006 r. u kogutów stad rodzicielskich brojlerów kurzych (broilers breeders – BB), w 2008 r. u brojlerów (commercial broilers – CB), a kolejne w 2008 r.

Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń *Enterococcus cecorum* u kur

Beata Dolka, Piotr Szeleszczuk

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

w Kanadzie (5, 6). Według najnowszych danych chorobę zdiagnozowano w Europie, w 2011 r. po raz pierwszy w stadach rodzicielskich brojlerów kurzych na Węgrzech i w Polsce (7, 8).

Standardową metodą diagnostyczną zakażeń wywołanych przez *E. cecorum* jest badanie bakteriologiczne. Odpowiedni sposób pobrania i transportu materiału, jako pierwszy istotny etap badania mikrobiologicznego, jest zasadniczym elementem decydującym o wiarygodności hodowli bakterii. Materiał do posiewów stanowią pobrane pośmiertnie próbki ze zmienionego chorobowo odcinka kręgosłupa (ropień), głowy kości udowej, stawów, szpiku kostnego oraz serca. Przyżyciowo pobiera się wymazy ze steku, próbki odchodów i krwi (5, 7, 9). *Enterococcus cecorum* wymaga do wzrostu warunków mikroaerofilnych (w atmosferze tlenowej wzbogaconej dwutlenkiem węgla). W celu izolacji *E. cecorum* używa się podstawowych podłoży wzbogaconych (agar z krwią owczą), jak i podłoży selektywnych, różnicujących, do hodowli paciorkowców z grupy D według Lancefield (m.in. KAA agar, Bile Esculin Azide Agar). Biochemiczne różnicowanie enterokoków opiera się na systemach API dla paciorkowców, jednakże mają one ograniczone zastosowanie w diagnostyce *E. cecorum*, podobnie jak automatyczne analizatory mikrobiologiczne (1, 10). Według dostępnych danych do fenotypowej analizy *E. cecorum* wykorzystano również system Biolog (5).

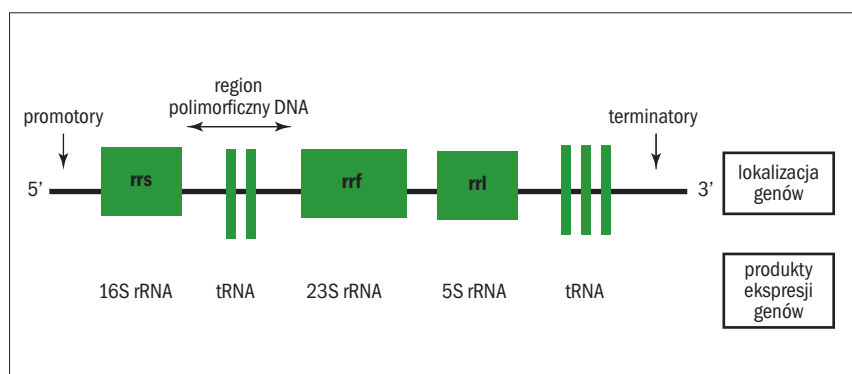
W diagnostyce mikrobiologicznej, oprócz klasycznych metod typowania

drobnoustrojów, polegających na analizie cech fenotypowych (metody fenotypowe), zastosowanie mają metody genotypowe oparte na analizie materiału genetycznego (11). Wszędzie tam, gdzie jest to możliwe i opłacalne, diagnostyka klasyczna *E. cecorum* zostaje zastąpiona albo uzupełniona metodami z zakresu biologii molekularnej. Techniki biologii molekularnej umożliwiają m.in. wykrycie obecności materiału genetycznego *E. cecorum*, identyfikację, typowanie (różnicowanie), odróżnianie od gatunków bakterii o zbliżonych cechach (*Streptococcus*, *Lactococcus*), a także wykrycie określonych genów warunkujących m.in. antybiotykooporność oraz określenie powiązań filogenetycznych. Wśród technik biologii molekularnej najczęściej stosowanych w diagnostyce zakażeń *E. cecorum* należą reakcja łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) i jej modyfikacje, techniki elektroforetyczne i sekwencjonowanie (12, 13, 14, 15, 16).

Matrycą w reakcji PCR jest DNA uzyskiwane z pojedynczej hodowli *E. cecorum* zawieszanej w jałowej dejonizowanej wodzie (100 µl) lub izolowane za pomocą komercyjnych zestawów. Według niektórych autorów lepszą, jakość DNA uzyskiwane z kolonii izolowanych z podłoża BHI (Brain Heart Infusion), niż z agaru z krwią (15).

Rybotypowanie z wykorzystaniem PCR

Różnicowanie bakterii opiera się często na genach kodujących rybosomalny RNA (rRNA) małej i dużej podjednostki rybosomu (rybotypowanie). Geny kodujące poszczególne rodzaje rRNA odpowiadają za syntezę podjednostek rybosomalnych 16S, 23S i 5S rRNA, układają się w operon *rnn*, i są charakterystyczne (bo wysoko konserwatywne ewolucyjnie) dla wszystkich bakterii (ryc. 1). Geny kodujące rRNA są rozdzielone regionami polimorficznymi o zróżnicowanej wielkości i sekwencji. Wybrane fragmenty operonu *rnn* stanowią cel molekularny nowoczesnych technik rybotypowania. Różnicowanie enterokoków z zastosowaniem metod rybotypowania można przeprowadzić przy użyciu różnych technik (np. hybrydyzacja, PCR).



Ryc. 1. Organizacja operonu rybosomalnego *rnn* u Procaryota

Celem molekularnym amplifikacji może być: polimorficzny region między genami kodującymi 16S i 23S rRNA (tzw. ITS PCR – internal transcribed spacer PCR); zmienny region wewnątrz genu kodującego 16S rRNA; region zawierający geny kodujące 16S i 23 rRNA oraz fragment polimorficzny między nimi; region kodujący tRNA; cała sekwencja genu kodującego 16 S rRNA (11, 17).

Technika PCR 16S rRNA pozwoliła zidentyfikować i sklasyfikować bakterie oraz przewidzieć ich relacje filogenetyczne. PCR w kierunku *Enterococcus* przeprowadzono z użyciem pary uniwersalnych starterów umożliwiających specyficzną amplifikację konserwatywnego regionu w obrębie rybosomalnego 16S RNA (rRNA) – małej podjednostki rybosomu, następnie dokonano sekwencjonowania otrzymanego produktu (18). Za pomocą tej metody Makrai i wsp. (7) potwierdzili zakażenie *E. cecorum* w stadzie brojlerów, uzyskując 97% zgodność badanego izolatu klinicznego ze szczepem referencyjnym. Jednakże w piśmiennictwie można znaleźć prace, w których nie stwierdzano różnic między blisko spokrewnionymi gatunkami (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*) przy zastosowaniu starterów kodujących 16S rRNA oraz wykazano rozbieżności (wysoką heterogenność) 16S rRNA w obrębie pojedynczego mikroorganizmu (16, 18, 19).

Analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych (ribosomal – intergenic spacer analysis – RISA) jest metodą umożliwiającą identyfikację *E. cecorum* (12). W technice tej amplifikowany jest region pomiędzy podjednostkami rybosomu 16S i 23S w genomie bakteryjnym. Ten intergenowy fragment (łącznik międzygenowy, intergenic spacer – IGS) cechuje wysoki polimorfizm długości sekwencji, ponadto w jego obrębie mogą znajdować się geny tRNA (ryc. 1). Baele i wsp. (12) zastosowali analizę polimorfizmu regionu międzygenowego (intergenic spacer) z tRNA do różnicowania enterokoków (tRNA intergenic spacer PCR; tDNA-PCR). Rozdziału produktów PCR dokonano za pomocą elektroforezy kapilarnej (capillary electrophoresis – CE) przy zastosowaniu ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems; 12). Warto podkreślić, że elektroforeza kapilarna jest stosunkowo nową metodą analityczną. Jej główną zaletą jest wysoka precyzja oznaczeń, małe zużycie odczynników, małe objętości próbek oraz krótki czas analiz. Dokonano automatycznej analizy uzyskanych elektroforegramów. Analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych dostarcza genetycznych odcisków palca enterokoków. Potwierdzono przydatność tej metody do odróżniania *E. cecorum* od innych gatunków enterokoków.

W innych badaniach Goh i wsp. (16) wykazali, że amplifikacja regionu (600-bp) genu kodującego białko opiekuńcze (chaperonin 60, Cpn60) może być uniwersalnym narzędziem stosowanym w celu identyfikacji bakterii (ID). Po amplifikacji regionu genu *Cpn60*, z zastosowaniem pary zdegenerowanych primerów, produkty PCR poddano hybrydyzacji. Potwierdzono, że opracowana metoda molekularna (Cpn60 gene ID hybridization method) pozwala na precyzyjne różnicowanie 17 gatunków enterokoków, w tym *E. cecorum* oraz *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *Vagococcus fluvialis*. Warto dodać, że za pomocą tej metody różnicowano gatunki enterokoków, np. *E. avium* i *E. pseudoavium*, w przypadku gdy zastosowanie innych metod (amplifikacji sekwencji ITS) okazało się nieużyteczne (16, 20).

Rodzajowo i gatunkowo – specyficzny PCR

Ke i wsp. (21) opracowali PCR z amplifikacją fragmentu genu *tuf* kodującego czynnik elongacyjny translacji (EF-Tu), co pozwoliło na wykrycie enterokoków na poziomie rodzaju. Według innych autorów identyfikację gatunków z rodzaju *Enterococcus* i większe właściwości różnicujące uzyskano stosując startery zaprojektowane do wewnętrznego fragmentu (*sodA_{int}*) genu *sodA*, kodującego dysmutazę manganową (MnSOD; 22). Zamplifikowane produkty PCR poddano reakcji sekwencjonowania, co pozwoliło na zidentyfikowanie 19 różnych gatunków *Enterococcus*, w tym *E. cecorum* oraz analizę stopnia pokrewieństwa genetycznego. Na podstawie sekwencji nukleotydów fragmentu *sodA_{int}* ustalono, że *E. cecorum* najwyższy stopień podobieństwa wykazuje z *E. columbae* (78,8%), następnie kolejno: z *E. dispar* (72,4%), *E. saccharolyticus* (71,7%), *E. hirae* (70,3%), *E. faecalis* i *E. sulfureus* (68,7%), *E. malodoratus* (67,6%), *E. avium* i *E. gallinarum* (67,4%), *E. flavescens* (66,9%), *E. casseliflavus* (66,4%), *E. faecium* (66,2%), *E. durans* i *E. raffinosus* (66,0%), *E. solitarius* (65,8%), *E. pseudoavium* (65,5%), *E. mundtii* (64,2%), a najniższy stopień z *E. seriolicida* (62,8%; 22).

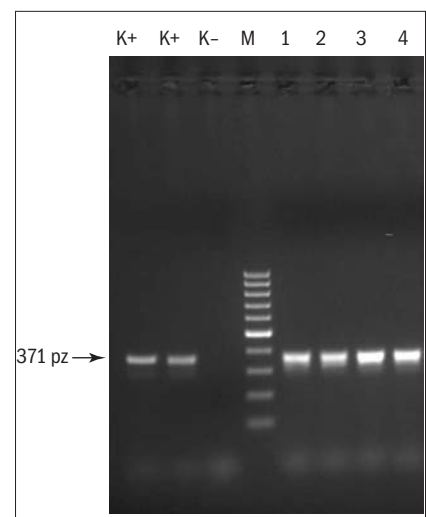
Multipleks PCR

Jackson i wsp. (15) opracowali multipleksowy PCR (multiplex – PCR) pozwalający na diagnozowanie kilku gatunków enterokoków, w tym *E. cecorum* w trakcie pojedynczej reakcji (ryc. 2). Równoczesne zastosowanie kilku par starterów w mieszaninie reakcyjnej umożliwiło powielenie kilku fragmentów DNA w jednej reakcji. Reakcja ta pozwala na zaoszczędzenie odczynników, czasu, jednak znacznie

trudniejsza jest optymalizacja metody i dobór starterów. Ze względu na występowanie konkurencyjności pomiędzy starterami w jednej mieszaninie reakcyjnej kluczową cechą jest ich specyficzność w stosunku do amplifikowanej sekwencji docelowej. Produkty PCR muszą się różnić długością, tak aby obecność każdego mogła zostać zauważona. Aby reakcja przebiegła prawidłowo, odpowiednie gatunki enterokoków zakwalifikowano do siedmiu grup. W grupie szóstej *E. cecorum* wykrywano równocześnie z *E. hirae* i *E. raffinosus*. Co ciekawe, badania porównawcze odnośnie do różnych metod stosowanych w identyfikacji enterokoków od drobiu wykazały wysoką zgodność (96%) multipleksowego PCR ze standardowymi metodami biochemicznymi, niższą z zestawami komercyjnymi: 92% z Vitek (bioMérieux), 88% z API ID 32 Strep (bioMérieux), 76% z BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (BD) (15).

Elektroforeza w pulsowym polu elektrycznym (PFGE)

Do różnicowania i określenia pokrewieństwa gatunków bakterii z rodzaju *Enterococcus* stosowano analizę restrykcyjną chromosomalnego DNA połączoną z elektroforezą pulsową REA – PFGE (restriction enzyme analysis – pulsed field gel electrophoresis). Metodę PFGE wykorzystano do różnicowania wankomycynoopornych szczepów enterokoków (vancomycin-resistant enterococcus – VRE; 5, 23). Chromosomalne DNA trawione jest rzadko tnącymi endonukleazami restrykcyjnymi (np. SmaI), o długich sekwencjach rozpoznania. Każdy enzym ma zdolność



Ryc. 2. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów reakcji PCR w kierunku *E. cecorum* (według metodyki Jacksona i wsp., 2004). Objasnienia: ścieżka M: marker 100bp DNA Ladder; K+: kontrola pozytywna; K-: kontrola ujemna, 1-4: izolaty bakterii z przypadków klinicznych w Polsce

rozpoznawania i trawienia charakterystycznej dla siebie sekwencji DNA. Izolacja DNA i trawienie restryktazami odbywa się w blockach agarozowych, co zabezpiecza chromosom bakteryjny przed fragmentacją. Powstałe fragmenty DNA o bardzo dużej masie cząsteczkowej (od 20–50kbp do 2–10Mbp) są następnie rozdzielane w polu elektrycznym o zmiennej długości pulsu i tworzą charakterystyczny dla każdego szczepu układ prążków. Przez porównanie układu prążków różnych szczepów można stwierdzić, czy należą one do tego samego czy też różnych klonów. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym uważana jest za „złoty standard” genotypowania wielu gatunków bakterii. Mimo wielu zalet, takich jak: wysoki potencjał dyskryminujący czy powtarzalność, metoda ta ma również wady, do których należą: ogromna pracochłonność, długi czas badania (ok. 7 dni), wysokie koszty (sprzęt, odczynniki), trudności w interpretacji otrzymanych wzorów restrykcyjnych, możliwość fałszywych wyników (np. nakładanie się na siebie fragmentów o zbliżonej wielkości, obecność fragmentów pochodzących z plazmidowego DNA). Do interpretacji wyników wykorzystuje się kryteria podane przez Tenovera i wsp. (24), zgodnie z którymi szczepy bakteryjne uznawane są za jednakowe, jeśli elektroforegramy ich DNA (wzory elektroforetyczne) zawierają jednakową liczbę prążków odpowiadających fragmentom DNA o takiej samej masie, co oznacza, że porównywane szczepy są w rzeczywistości klonami tego samego szczepu. Istnieje konieczność ujednoczenia systemu interpretacji uzyskiwanych wzorów restrykcyjnych, opracowania wystandaryzowanych, których wyniki będą zestawione w dostępnych bazach danych.

Współczesna systematyka pozwala na klasyfikację mikroorganizmów pod względem pokrewieństwa ewolucyjnego między gatunkami na podstawie danych molekularnych. Poyart i wsp. (22) wyznaczyli powiązania filogenetyczne między enterokokami i opracowali drzewo filogenetyczne, grupując gatunki enterokoków według podobieństwa na podstawie zależności pomiędzy sekwencjami genu *sodA_{int}* w oparciu o metodę NJ (neighbor joining – metoda przyłączania najbliższego sąsiada). Wykazano 98,1% zgodność sekwencji genu *sodA_{int}* *E. cecorum* i *E. columbae*. Należy podkreślić, że taka graficzna konstrukcja drzewa filogenetycznego obrazuje nie tylko pokrewieństwo między gatunkami, ale także mechanizmy narastania zmienności, ułatwia określenie tempa zachodzących przemian ewolucyjnych (mutacji) i poznanie mechanizmów prowadzących do powstania dzisiejszego zróżnicowania genetycznego (22).

Praktyczne zastosowanie

Metody molekularne wykorzystano w diagnostyce zakażeń wywołanych przez *E. cecorum* w stadach kurcząt brojlerów w Holandii w 2008 r. (9). Badaniem objęto stada kurcząt brojlerów, w których zaobserwowano objawy kliniczne, oraz odpowiednie stado rodzicielskie i wylęgarnie, od których pochodziły chore brojlery. Od chorych kurcząt brojlerów *E. cecorum* izolowano z uszkodzeń (worek osierdziowy, stawy, szpik kostny). Natomiast w stadach rodzicielskich nie obserwowano żadnych objawów klinicznych, nie wyizolowano *E. cecorum* z narządów zmienionych (m.in. zapalenie jajowodu, stawów, otrzewnej, stłuszczenie wątroby, *pododermatitis*, torbiele jajnika, guz wątroby), ale izolowano z wymazów ze steku, próbek jajowodu, szpiku kostnego i z krwi. Z wylęgarni pobrano próbki powietrza i skorupy jaj z zamarych zarodków. W badanych próbkach nie stwierdzono *E. cecorum*. Wszystkie izolaty potwierdzono, dokonując analizy polimorfizmu długości fragmentu intergenowego (tRNA intergenic spacer PCR). Analiza pokrewieństwa genetycznego (PFGE) wykazała duże zróżnicowanie genetyczne *E. cecorum* izolowanych od kurcząt brojlerów, podczas gdy *E. cecorum* izolowane ze stad rodzicielskich w ok. 68% przypadkach były klonami. Badania molekularne potwierdziły brak jakiegokolwiek pokrewieństwa *E. cecorum* izolowanych ze stad rodzicielskich ze szczepami izolowanymi od ich potomstwa, u którego wystąpiła choroba. Przeprowadzone badania genetyczne izolatów *E. cecorum* pozwoliły na wykluczenie transowarialnej drogi zakażenia kurcząt brojlerów (9).

Na podstawie przeprowadzonych badań (testy biochemiczne, sekwencjonowanie 16S rRNA, PFGE) *E. cecorum* izolowanych od kurcząt brojlerów w Kanadzie wykazano dużą różnorodność w obrębie szczepów *E. cecorum* obecnych w jelitach zdrowych kurcząt, co ciekawe większość szczepów izolowana od chorych ptaków była podobna do siebie. Wciąż niewiele wiadomo odnośnie do związku i różnic między szczepami enterokoków pochodzącymi z klinicznych przypadków enterokokowej choroby zwyrodnieniowej stawów kręgosłupa u kur a szczepami stanowiącymi składnik fizjologicznej flory jelitowej (25).

Techniki molekularne mają również zastosowanie w diagnostyce enterokoków opornych na antybiotyki, co ma istotne znaczenie w postępowaniu terapeutycznym, opracowaniu metod przeciwdziałających pojawianiu się szczepów, wieloopornych poprzez m.in. ograniczenia dotyczące podaży antybiotyków. Należy podkreślić, że enterokoki posiadają wrodzoną

oporność na wiele antybiotyków, a szczepy wankomycynooporne (VRE) są obecnie jednym z najpoważniejszych problemów zakażeń szpitalnych u ludzi. Potwierdzono oporność *E. cecorum* izolowanych od chorych kurcząt na wiele antybiotyków, m.in. na penicyliny, cefalosporyny, aminoglikozydy, makrolidy i fluorochinolony. Według najnowszych danych na podstawie przeprowadzonych badań bakteriologicznych i molekularnych (PCR, PFGE, hybrydyzacja, sekwencjonowanie) po raz pierwszy potwierdzono występowanie fenotypu oporności na wankomycynę (vanA) u *E. cecorum* izolowanego od kurcząt brojlerów w Japonii (26). Według Cauwerts i wsp. (13) nabyta oporność na tetracykliny cechująca enterokoki (w tym *E. cecorum*) izolowane od kurcząt brojlerów związana jest z występowaniem u enterokoków genu *erm* (B) odpowiedzialnego za wytworzenie oporności na linkozamidy, makrolidy i streptograminy B (oporność typu MLS_B; macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant; 13). Geny oporności na antybiotyki umiejscowione są u enterokoków na plazmidach i transpozonach, które łatwo mogą zostać przeniesione na inne drobnoustroje. Analiza sekwencji genu oporności na antybiotyki umożliwia potwierdzenie transferu DNA pomiędzy szczepami.

Metody molekularne wykorzystano również do wykrywania obecności genów kodujących czynniki wirulencji enterokoków warunkujące ich chorobotwórczość, m.in. gen *gelE* (kodujący żelatynazę), *cylA* (cytolizynę), *asa1* (substancję agregującą), *hyl* (hialuronidazę), *esp* (białko powierzchniowe). Przypuszcza się, że dużą rolę w rozwoju zakażeń wywołanych przez *E. cecorum* mogą odgrywać czynniki inwazyjności tych drobnoustrojów, warunkujące ich wyższą zjadliwość (1, 5). Identyfikacja molekularna poszczególnych markerów zjadliwości pozwoli na określenie ich częstości występowania wśród *E. cecorum* izolowanych od kurcząt chorych, jak i zdrowych oraz na wyróżnienie tzw. wirulotypów, zrozumienie patogenezy, a nawet umożliwi wykorzystanie ich w celu produkcji leków przeciwbakteryjnych (np. jako antygenów w projektowaniu szczepionek, użycie inhibitorów proteaz).

Rozwój technik biologii molekularnej sprawił, że obok metod klasycznych są one wykorzystywane w diagnostyce zakażeń drobiu wywołanych przez *Enterococcus cecorum*, zacinając być wdrażane do rutynowych badań, znajdują coraz szersze zastosowanie i stwarzają nowe możliwości diagnostyczne. Ponadto metody oparte na analizie materiału genetycznego charakteryzują się dużą czułością, powtarzalnością, pozwalają na przyspieszenie standardowej mikrobiologicznej procedury

diagnostycznej *Enterococcus cecorum*, co ma istotne znaczenie praktyczne.

Piśmiennictwo

- Herdt De P, Defoort P, Steelant Van J, Swam H, Tanghe L., Goethem Van S., Vanrobaeys M.: *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2008, **78**, 44–48.
- Jones K., Barnes H. J., Martin M.: Spinal abscesses in male broiler breeders. http://www.ces.ncsu.edu/depts/poulsaci/conference_proceedings/broiler_breeder/2007/jones_2007.pdf
- Devriese L. A., Cauwerts K., Hermans K., Wood A. M.: *Enterococcus cecorum* septicaemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. *Flemish Vet. J.* 2002, **71**, 219–221.
- Wood A. M., MacKenzie G., MacGilliveray N. C., Brown L., Devriese L. A., Baele M.: Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. *Vet. Rec.* 2002, **150**, 27.
- Robbins K., Borst L., Martin M. P., Jay P., Suyemoto M., Barnes H. J.: Phenotypic analysis of *Enterococcus cecorum* field isolates associated with vertebral osteoarthritis. AAAP Scientific Program – AVMA Annual Convention. Atlanta, GA. 2010. <http://www.cvm.ncsu.edu/dph/p/hm/documents/Robbinsaaap2010.pdf>
- Stalker M. J., Brash M. L., Weisz A., Ouckama R. M., Slavic D.: Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, **22**, 643–645.
- Makrai L., Nemes C., Simon A., Ivanics E., Dudás Z., Fodor L., Glávits R.: Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. *Acta Vet. Hung.* 2011, **59**, 11–21.
- Dolka B., Szeleszczuk P.: Enterokokowa choroba zwyrodnieniowa stawów kręgosłupa u kur. *Medycyna Wet.* 2012, **68**, 153–158.
- Kense M. J., Landman W. J.: *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *Avian Pathol.* 2011, **40**, 603–612.
- Devriese L. A., Ceysens K., Haesebrouck F.: Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from the intestines of different animal species. *Lett. Appl. Microbiol.* 1991, **12**, 137–139.
- Krawczyk B.: Narzędzia diagnostyki molekularnej w typaniu genetycznym (genotypowaniu). Kształcenie zamawiane Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska. 2009. <http://www.pg.gda.pl/chem/pl/zamawiane/images/stories/w-12-13.pdf>
- Baele M., Baele P., Vaneechoutte M., Storms V., Butaye P., Devriese L. A., Verschraegen G., Gillis M., Haesebrouck F.: Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 4201–4207.
- Cauwerts K., Decostere A., De Graef E. M., Haesebrouck F., Pasmans F.: High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm(B) gene. *Avian Pathol.* 2007, **36**, 395–399.
- Dutka – Malen S., Evers S., Courvalin P.: Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 24–27.
- Jackson C. R., Fedoka – Cray P. J., Baret J. B.: Use of a genus – and species – specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 3558–3565.
- Goh S. H., Facklam R. R., Chang M., Hill J. E., Tyrrell G. J., Burns E. C., Chan D., He C., Rahim T., Shaw C., Hemmingsen S. M.: Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 3953–3959.
- Śledzińska A., Samet A., Gładysz A.: *Enterokoki jako bakterie zakażeń szpitalnych*. Continuo, Wrocław, 2009.
- Patel R., Piper K. E., Rouse M. S., Steckelberg J. M., Uhl J. R., Kohner P., Hopkins M. K., Cockerill III F. R., Kline B. C.: Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 3399–3407.
- Fox G. E., Wisotzky J. D., Jurtschuk Jr. P.: How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992, **42**, 166–170.
- Tyrrell G. J., Bethune R. N., Willey B., Low D. E.: Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997, **35**, 1054–1060.
- Ke D., Picard F. J., Martineau F., Menard C., Roy P. H., Ouellette M., Bergeron M. G.: Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 3497–3503.
- Poyart C., Quesnes G., Trieu – Cuot P.: Sequencing the gene encoding manganese dependant superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 415–418.
- Bogaard A. E. van den, Willems R., London N., Top J., Stobberingh E. E.: Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, **49**, 497–505.
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., Mickelsen P. A., Murray B.E., Persing D. H., Swaminathan B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 2233–2239.
- The Poultry Site: Understanding *E. cecorum* – an Emerging Disease in Canada. 2011. <http://www.thepoultrysite.com/articles/1875/understanding-eme-cecorum-em-emerging-disease-in-canada>
- Harada T., Kawahara R., Kanki M., Taguchi M., Kumeda Y.: Isolation and characterization of vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from retail poultry in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, **153**, 372–377.

Dr Beata Dolka, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa, e-mail: Beata_Dolka@sggw.pl