

Received: 2012.04.24
Accepted: 2012.06.05
Published: 2012.06.29

Kwasy mikołowe – potencjalne markery diagnostyki oportunistycznych zakażeń mikroorganizmami z podrzędu *Corynebacterineae**

Mycolic acids – potential biomarkers of opportunistic infections caused by bacteria of the suborder *Corynebacterineae*

Konrad Kowalski^{1,2}, Rafał Szewczyk³, Magdalena Druszczyńska¹

¹ Zakład Immunologii Komórkowej, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki

² Laboratorium Chemii Biomedycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

³ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Kwasy mikołowe to jeden z podstawowych elementów budowy ściany komórkowej bakterii rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae*. Pod względem taksonomicznym przynależą do nich wielu przedstawicieli oportunistycznych patogenów człowieka, w tym między innymi gatunki składające się na rodzaje: *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia* czy *Rhodococcus*. Kwasy mikołowe mogą stanowić łącznie 20–40% suchej masy ściany komórkowej tych mikroorganizmów wykazując jednocześnie dużą różnorodność strukturalną w obrębie każdej z rodzin oraz poszczególnych gatunków. Cechy te pozwalają na wyróżnienie tej rodziny związków jako potencjalnych markerów diagnostycznych w wykrywaniu oportunistycznych infekcji bakteryjnych, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Szanse jakie dają nowoczesne techniki analizy chemicznej, ze szczególnym uwzględnieniem spektrometrii mas dają możliwości na rozwinięcie tego kierunku badań pozwalając na stworzenie nowej metody chemiotaksonomicznej dla detekcji oraz różnicowania przedstawicieli podrzędu *Corynebacterineae*.

Słowa kluczowe:

kwasy mikołowe • *Corynebacterineae* • biomarkery

Summary

Mycolic acids are one of the basic elements of the cell wall structure of bacteria belonging to the suborder *Corynebacterineae*, constituting from 20% to 40% of dry weight. Additionally, they show high structural diversity within each family and species. Nowadays, profiles of mycolic acids are widely described for the genus *Mycobacterium*, the causative agent of tuberculosis. However, the suborder *Corynebacterineae* also includes many representatives of opportunistic human pathogens, e.g. *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia* and *Rhodococcus*. Currently, an increased infection risk caused by this group of microorganisms especially in immunocompromised patients has been observed. Better knowledge of mycolic acid profiles for *Corynebacterineae* may allow identification of mycolic acids as diagnostic markers in the detection of opportunistic bacterial

* Druk publikacji sfinansowany przez Laboratorium Chemii Biomedycznej IITD PAN „Neolek”.

infections. Modern techniques of chemical analysis, including mass spectrometry, may enable the development of new chemotaxonomic methods for the detection and differentiation of bacteria within the suborder *Corynebacterineae*.

Key words: mycolic acids • *Corynebacterineae* • biomarkers

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1002082>

Word count: 2804

Tables: 1

Figures: 2

References: 69

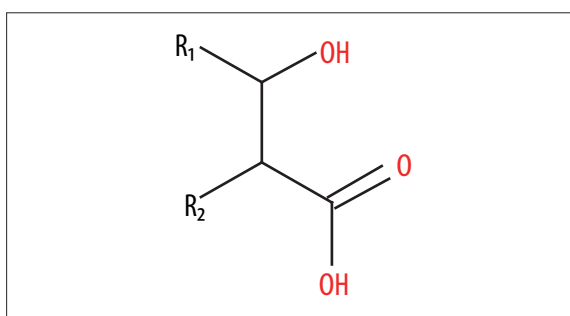
Adres autora: mgr Konrad Kowalski, Laboratorium Chemii Biomedycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: kowalski.biotech@gmail.com

KWASY MIKOLOWE – BUDOWA CHEMICZNA I ZNACZENIE BIOLOGICZNE

Kwasy mikołowe po raz pierwszy wyizolował Anderson w 1929 r., a ich dokładną strukturę określono dopiero w 1950 roku [3,4]. Są one długołańcuchowymi α -hydroksy β -alkilo kwasami tłuszczowymi, w budowie których – pod względem strukturalnym – wyróżnia się dłuższy łańcuch meromikołowy (R_1) oraz krótszy łańcuch α -węglowodorowy (α -alkilowy) (R_2) (ryc. 1). Związki te to jeden z podstawowych elementów budowy ściany komórkowej bakterii rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae*, rodzin: *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Segniliparaceae*, *Tsukamurellaceae* i *Williamsiaceae*. Kwasy mikołowe wykazują wysoki poziom zróżnicowania strukturalnego jednocześnie stanowiąc wykładnik pokrewieństwa międzygatunkowego (tab. 1).

Najpełniej zbadanymi i opisanymi w literaturze kwasami mikołowymi o 70–90 atomach węgla w cząsteczce charakteryzuje się rodzaj *Mycobacterium*. Zbudowane są z nasyczonego łańcucha α -węglowodorowego o 20, 22 bądź 24 atomach węgla oraz dłuższego łańcucha meromikołowego, w obrębie którego wyróżniamy dwie charakterystyczne pozycje funkcjonalne – dystalną oraz proksymalną [31]. U prątków gruźlicy dominujący typ kwasów mikołowych (>70%) stanowią α -mikołany mające w obu pozycjach funkcjonalnych podwójne wiązania węglowe lub pierścienie cyklopropanowe. Pozostała część (10–15%) to keto- i metoksymikołany. Charakteryzuje ich obecność w pozycji proksymalnej, pierścienia cyklopropanowego w konformacji *cis* bądź *trans*, a w pozycji dystalnej odpowiednio grupy tlenowej bądź metoksylowej [15].

Kwasy mikołowe odgrywają ważną rolę w strukturze ściany komórkowej wpływając na jej integralność oraz przepuszczalność względem związków zarówno o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, w tym leków [49]. Obecność pierścieni cyklopropanowych w strukturze tych związków ma bezpośredni związek ze stopniem integralności ściany komórkowej bakterii oraz chroni komórki przed negatywnym wpływem stresu oksydacyjnego. Dowiedziono, że ubytek postaci keto kwasów mikołowych prowadzi do ograniczenia proliferacji w komórkach makrofagów. Natomiast



Ryc. 1. Ogólny schemat budowy kwasów mikołowych, R_1 – łańcuch meromikołowy, R_2 – łańcuch α -alkilowy

delecja pierścienia cyklopropanowego w pozycji proksymalnej, bądź ubytek zarówno form keto jak i metoksy prowadzi do znaczącego osłabienia wzrostu prątków w organizmie myszy [57].

Kwasy mikołowe mają wiele unikatowych cech, które pozwalają na sklasyfikowanie ich jako potencjalnych markerów diagnostycznych infekcji wywołanych przez mikroorganizmy z podrzędu *Corynebacterineae*. Są markerami ściśle i nierozzerwalnie związanymi ze ścianą komórkową mikroorganizmów. Nie są syntetyzowane w organizmie człowieka, a więc detekcja tych związków w materiale badanym stanowi bezpośredni dowód na obecność drobnoustrojów. Ponadto cechują się wysokim stopniem różnorodności pod względem struktury chemicznej, co znajduje bezpośrednie odzwierciedlenie w taksonomii. Kwasy mikołowe mogą stanowić łącznie 20–40% suchej masy ściany komórkowej. Pozwala to na łatwiejsze wykrycie tych związków w materiale badanym zawierającym żywe mikroorganizmy bądź fragmenty ich osłon komórkowych [7]. Dodatkowym czynnikiem ułatwiającymi ich detekcję jest duża stabilność chemiczna, a co za tym idzie możliwość wykrywania ich obecności nawet w materiale archeologicznym [13].

Obecnie główne zainteresowanie kwasami mikołowymi wiąże się nierozzerwalnie z diagnostyką gruźlicy płuc. Najnowocześniejsze techniki spektrometrii mas i chromatografii pozwalają na wykrycie kwasów mikołowych w materiale badanym od pacjentów uzyskując wysoką czułość (94–95%), jak i swoistość (93–95%) przeprowadzonego testu [52]. Jedynym ograniczeniem tych metod jest trudność



Tabela 1. Zróżnicowanie długości kwasów mikołowych w obrębie podrzędu *Corynebacterineae*

Rodzina	Rodzaj	Gatunek	Całkowita liczba atomów węgla	Piśmiennictwo
<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	22–38	[35]
<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Dietzia sp.</i>	30–40	[32,38,63]
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. equi</i>	28–50	[19,38,57,59]
		<i>R. fascinas</i>	34–54	[38,57]
	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia sp.</i>	42–64	[16,26,35]
		<i>N. pseudosporangifera</i>	32–62	[37]
	<i>Smaragdicoccus</i>	<i>Smaragdicoccus sp.</i>	43–49	[1]
<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i>	<i>G. amarae</i>	48–58	[27,38,57]
		<i>G. sputi</i>	52–64	
	<i>Skermania</i>	<i>Skermania sp.</i>	58–64	[11]
	<i>Millisia</i>	<i>Millisia sp.</i>	44–52	[51]
<i>Williamsiaceae</i>	<i>Williamsia</i>	<i>Williamsia sp.</i>	52–56	[23,64,67]
<i>Tsakamurellaceae</i>	<i>Tsakamurella</i>	<i>T. spumae</i>	62–78	[41,66]
		<i>T. carboxydivorans</i>	81–95	[42]
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>	70–90	[8]
<i>Segniliparaceae</i>	<i>Segniliparus</i>	<i>Segniliparus sp.</i>	90–110	[9,17,28]

detekcji kwasów mikołowych z materiału zawierającego bardzo niskie miana bakterii, wskazujące na konieczność ich uprzedniego wstępno namnażania [49,52].

METODY WYKRYWANIA I ANALIZY KWASÓW MIKOŁOWYCH

Wraz z rozwojem nowych technik analizy chemicznej więcej uwagi zaczęto poświęcać kwasom mikołowym jako potencjalnym markerom różnicowania zwłaszcza w rodzaju *Mycobacterium*. Początkowo analizie poddawano wydzielone z komórek w wyniku metanolizy estry metylowe kwasów mikołowych uzyskane w wyniku metanolizy całych komórek. Techniki chromatografii gazowej pozwoliły na szczegółowe badania strukturalne kwasów mikołowych [14]. Dowiedziono powstawania swoistych produktów pirolizy estrów metylowych kwasów mikołowych charakterystycznych dla rodzaju *Mycobacterium*. W rezultacie udowodniono, że technika pirolitycznej chromatografii gazowej pozwala na łatwe rozróżnienie prątków gruźlicy od patogenów, takich jak *Nocardia* czy *Rhodococcus* [24,35].

Zastosowanie w analizie kwasów mikołowych znalazły również techniki jedno- oraz dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (1D/2D-TLC). Cechujące się łatwością wykonania pozwalają na rozdzielenie badanej mieszaniny zarówno pod względem masy cząsteczkowej, jak i na frakcje alfa-, keto- i metoksy- kwasów mikołowych [34]. Preparatywna chromatografia cienkowarstwowa stanowiła jeden z etapów, dla późniejszej analizy z wykorzystaniem technik chromatografii gazowej czy jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) [33,45].

Kolejną techniką pozwalającą na wykrycie oraz charakterystykę kwasów mikołowych jest wysoko sprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Metoda ta opiera się na rozdziale chromatograficznym estrów p-bromofenacylowych kwasów mikołowych wykazujących absorpcję promieniowania ultrafioletowego (UV) [9]. Metoda ulegała późniejszym modyfikacjom np. z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego [59,60].

Znaczny postęp w dziedzinie lipidomiki oraz spektrometrii mas umożliwia obecnie dużo bardziej szczegółowe analizy profilów kwasów mikołowych. Duże możliwości rozdzielcze oraz czułość techniki opierającej się na desorpcji laserowej z udziałem matrycy oraz detektorem czasu przelotu jonów (MALDI-TOF) uczyniły z niej doskonałe narzędzie do badania wysokocząsteczkowych związków, w tym również tych o charakterze lipidowym. Szczególną zaletą tego typu urządzeń jest możliwość bezpośredniego analizowania cząsteczek kwasów mikołowych bez potrzeby przeprowadzania wcześniejszej derywatywacji [43]. Brak możliwości rozróżnienia izomerów będących kwasami mikołowymi o tej samej masie cząsteczkowej, lecz innej strukturze chemicznej sprawia, że technika ta nie pozwala na przeprowadzenie pełnego różnicowania gatunków w obrębie rodzaju *Mycobacterium* oraz spokrewnionych z nimi mikroorganizmów [48]. Z tego też powodu najczęściej stosuje się ją w połączeniu z technikami chromatografii cienkowarstwowej pozwalającymi na zdobycie więcej danych o strukturze chemicznej związku [29,61].

Obecnie do kompleksowej analizy kwasów mikołowych najodpowiedniejsze wydają się tandemowe spektrometry

mas typu MS/MS wraz ze źródłem jonów typu elektro-spray (ESI). Mnogość trybów skanowania pozwala na zebranie maksymalnie szczegółowych danych na temat badanych związków pod względem jakościowym. Pozwalają na ocenę wielkości całych cząsteczek, długości i struktury poszczególnych łańcuchów węglowodorowych, stopnia nasycenia oraz obecności ewentualnych grup funkcyjnych w strukturze kwasów mikolowych.

Połączenie MS/MS z technikami separacji, takimi jak chromatografia cieczowa (LC) czy elektroforeza kapilarna (CE) pozwala na bardziej szczegółową analizę zarówno jakościową jak i ilościową. Dowiedziono dużej skuteczności stosowania technik MS/MS w różnicowaniu profili kwasów mikolowych charakterystycznych dla poszczególnych gatunków *M. tuberculosis* oraz w identyfikowaniu *R. equi* [19,55]. Zastosowanie tego typu urządzeń pozwoliło by na potencjalnie wytypowanie markerów swoistych dla rodzin, rodzajów czy wreszcie poszczególnych gatunków mikroorganizmów zawierających kwasy mikolowe (w swojej ścianie komórkowej).

MIKROORGANIZMY ZAWIERAJĄCE KWASY MIKOLOWE WYWOŁUJĄCE INFEKCJE OPORTUNISTYCZNE U LUDZI

Drobnoustroje zawierające kwasy mikolowe w strukturze ściany komórkowej stanowią dużą i złożoną grupę mikroorganizmów. Wśród nich najczęściej wymienianym patogenem człowieka są prątki *M. tuberculosis*, czynnik etiologiczny gruźlicy. Prątki kwasooporne wywołują również oportunistyczne zakażenia u ludzi – mikobakteriozy. Obecnie dowodzi się coraz większego udziału bakterii należących do rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae* w zakażeniach oportunistycznych dotychczas sklasyfikowanych jako inne mikroorganizmy [47]. Badania polimorfizmu w obrębie podjednostki 16S rRNA są obecnie najpewniejszą metodą dokładnego rozróżnienia tych mikroorganizmów. Ponadto stosuje się metody hybrydyzacji DNA-DNA oraz różnorakie markery chemiotaksonomiczne [42,44]. Dodatkowym potencjalnym markerem różnicowania w obrębie podrzędu *Corynebacterineae* wydają się kwasy mikolowe. Ich wykrywanie oraz różnicowanie zostało szczegółowo opisano w obrębie rodzaju *Mycobacterium*, a dotychczasowe wyniki badań zapewne znajdą potencjalne zastosowanie w diagnostyce zakażeń wywołanych przez mikroorganizmy zawierające kwasy mikolowe.

RHODOCOCCUS

Gram-dodatnie bakterie z rodzaju *Rhodococcus*, szczególnie rozpowszechnione w glebie, stanowią różnorodną grupę mikroorganizmów, spośród których jedynie dwa cechują się patogennością względem ludzi i zwierząt oraz roślin. Ich ściana komórkowa charakteryzuje się obecnością kwasów mikolowych o całkowitej liczbie atomów węgla w cząsteczce w zakresie 32–66. Pod względem stopnia nasycenia łańcuchów węglowodorowych zarówno α -alkilowego jak i meromikolowego w obrębie rodzaju *Rhodococcus* możemy wyodrębnić dwie pogrupy. Do pierwszej z nich zaliczamy ludzki patogen oportunistyczny – *R. equi*, znajdujący zastosowanie w procesach bioremediacji – *R. erythropolis* oraz gatunki *R. baikourensis* i *R. pyridinivorans* [67,69]. Mikroorganizmy te cechują się dużym stopniem wysycenia łańcuchów węglowodorowych kwasów mikolowych

o długości 28–50 atomów węgla [20,38,56,58]. *R. equi* charakteryzuje się największym udziałem w budowie ściany komórkowej w pełni nasyconych kwasów mikolowych o długości wynoszącej odpowiednio 32, 34 i 36 atomów węgla [19]. Przedstawicielami drugiej, znacznie liczniejszej podgrupy, są m.in. powszechny patogen roślin *R. fascians* oraz bakterie, takie jak *R. rhodnii* czy *R. ruber*. Ich ściana komórkowa cechuje się obecnością kwasów mikolowych o długości 34–54 atomów węgla z jednoczesnym ponad 20% udziałem związków o charakterze wielonienasyconym [38,56]. Dowiedziono wpływu przyswajanego źródła węgla na szczegółowy profil kwasów mikolowych w obrębie rodzaju *Rhodococcus* [54]. Niemniej tak duże różnice w wielkości oraz strukturze cząsteczek kwasów mikolowych wśród tych mikroorganizmów wydają się cechą gatunkową, niezależną od warunków wzrostu *in vitro*. Różnice dotyczące szczególnie nasycenia łańcuchów węglowodorowych kwasów mikolowych w ścianie komórkowej tych bakterii mogą być podyktowane stopniem przepuszczalności ściany komórkowej bezpośrednio związanym z trybem bytowania danego gatunku. Obecnie cechy morfologiczne i metaboliczne nie dają całkowitej pewności co do prawidłowego sklasyfikowania *Rhodococcus*. Dopiero analizy polimorfizmu genów kodujących 16S rRNA wskazują na przynależność części szczepów do spokrewnionych rodzajów *Dietzia* oraz *Corynebacterium* [39,44].

NOCARDIA

Bakterie z rodzaju *Nocardia* stanowią liczną grupę drobnoustrojów glebowych występujących zarówno w klimacie umiarkowanym, strefach subtropikalnych, jak i tropikalnych. Stanowią czynnik etiologiczny nocardioz zwierzęcych – infekcji objawiających się głównie zapaleniem sutków [18]. Przypadki nocardioz u ludzi odnotowywane są sporadycznie, u chorych z obniżoną odpornością wywołując infekcje w obrębie osierdzia, nerek, skóry i tkanek miękkich czy układu oddechowego [18,25,68]. Profil kwasów mikolowych charakterystycznych dla rodzaju *Nocardia* obejmuje wielonienasycone cząsteczki o długości 42–64 atomów węgla. Jedynie *N. pseudosporangifera* zawiera w ścianie komórkowej kwasy mikolowe o wielkości cząsteczek C_{32} – C_{62} [37]. Jednocześnie poszczególne gatunki różnią się ilościowym stosunkiem poszczególnych związków względem siebie. Dla *N. pseudovaccinii* dominującymi postaciami kwasów mikolowych są C_{52} , C_{54} i C_{56} , podczas gdy dla *N. veterana* mają one długość C_{56} , C_{58} , C_{60} [16,26]. Łańcuchy α -alkilowe kwasów mikolowych nocardii cechują się długością 12–18 atomów węgla z możliwie jednym wiązaniem podwójnym. Profil kwasów mikolowych pokrywa się z opisany dla rodzaju *Rhodococcus*, będąc potencjalnie trudno odróżnialny zwłaszcza w obrębie podgrupy tych mikroorganizmów. Niemniej, już różnicowanie w obrębie stopnia nasycenia łańcuchów pozwoli na wydzielenie gatunku *R. equi*.

SMARAGDICOCCUS

W obrębie rodziny *Nocardiaceae* wyróżnia się dodatkowo rodzaj *Smaragdicoccus*, reprezentowany przez gatunek *S. niigatensis* wyizolowany z gleby na terenach wydobywczych ropy naftowej. Dotychczas nie odnotowano jego patogenności u ludzi. Cechuje się dużą konserwatywnością wielkości cząsteczek kwasów mikolowych, mieszczących



się w zakresie 43–49 atomów węgla, oraz dużą różnorodnością pod względem stopnia nasycenia [1]. Taki skład kwasów mikołowych pozwoliłby na potencjalnie łatwe wykluczenie obecności tych mikroorganizmów spośród innych bakterii o podobnej sumarycznej liczbie atomów węgla w cząsteczkach kwasów mikołowych mających znaczenie kliniczne. Charakterystycznie nieparzysta liczba atomów węgla może odnosić się bezpośrednio do obserwacji przeprowadzonych u *R. erythropolis* i dotyczyć ewolucyjnego przystosowania do przyswajania jako źródła węgla związków o strukturze liniowej i parzystej liczbie atomów węgla [54]. Obserwacja ta wskazuje na potencjalne możliwości skriningu na podstawie składu kwasów mikołowych wśród mikroorganizmów mogących mieć potencjalne zastosowanie w procesach biodegradacji.

DIETZIA

Rodzaj *Dietzia* zdefiniowano po wyodrębnieniu mikroorganizmów klasyfikowanych jako *Rhodococcus maris* w 1995 r. [46]. Obecnie obejmuje on 12 gatunków bytujących zarówno w glebie, jak i środowiskach wodnych. Szczepy patogenne względem ludzi wywołują zakażenia oportunistyczne u pacjentów z obniżoną odpornością. Gatunek *D. maris* został dotychczas wyizolowany z powierzchni protezy stawu biodrowego, a także rozpatrywany z przypadku bakteriemii oraz rozwarstwienia regionu aorty [5,47]. Bezpośredni udział w infekcjach oportunistycznych u ludzi wywołanych przez *D. papillomatosus* oraz *D. cinnamea* nie został dotychczas w pełni udowodniony [32,39]. Profil kwasów mikołowych, dotychczas przeanalizowanych przedstawicieli rodzaju *Dietzia* wskazuje na pewien stopień konserwatywności w wielkości i strukturze cząsteczek. Wielkość molekuł kwasów mikołowych waha się w granicach 30–40 atomów węgla przy dominującej w pełni nasyconej formie łańcuchów węglowodorowych o długości łańcucha α -alkilowego w granicach 14–18 atomów węgla [32,38,63]. Dominującą rolę w ścianie komórkowej *D. maris* odgrywają związki o wielkości 36 i 35 atomów węgla stanowiąc wspólnie ponad połowę wszystkich kwasów mikołowych [38,46]. Profil ten wykazuje wiele podobieństw z gatunkiem *R. equi*, u którego dominującą rolę odgrywają kwasy mikołowe o długości łańcucha węglowego 32, 34 i 36 atomów węgla. Potencjalnym markerem różnicującym pomiędzy *R. equi* a mikroorganizmami z rodzaju *Dietzia* wydają się kwasy mikołowe o 35 atomach węgla, występujące w znikomej ilości w ścianie komórkowej rodzaju *Rhodococcus*. Dodatkowo cennym markerem różnicującym może być wzajemny stosunek ilościowy kwasów mikołowych o długościach łańcuchów węglowych wynoszących odpowiednio: 34, 35 i 36. Brakuje jednak dalszych badań kwasów mikołowych charakterystycznych dla rodzaju *Dietzia*, by wyciągać definitywne wnioski o podobieństwach między tymi mikroorganizmami i pewnego wyodrębnienia markerów różnicowania.

GORDONIA

Mikroorganizmy należące do rodzaju *Gordonia* wywołują infekcje oportunistyczne u ludzi oraz biorą udział w procesach bioremediacji oraz biodegradacji ksenobiotyków. Drobnoustroje te najczęściej izolowane są z przypadków bakteriemii rozprzestrzeniających się z centralnych wtkół u pacjentów przewlekłe hospitalizowanych. Izolowane były również od chorych z zapaleniem płuc, ucha środkowego,

infekcjami skóry lub innych tkanek. Wśród mikroorganizmów najczęściej wywołujących infekcje układu krwionośnego u ludzi wymienia się: *G. bronchialis*, *G. terrae*, *G. sputi*, *G. polyisoprenivorans* oraz *G. otitidis* [22]. W obrębie *Gordonia* wyróżnia się dwie podgrupy cechujące się obecnością kwasów mikołowych o wielkości mieszczącej się odpowiednio w zakresach 48–58 oraz 52–64 atomów węgla. Do pierwszej z grup należą m. in. niektóre szczepy *G. amarae*, *G. amicalis* oraz *G. sthwensis*. Do drugiej grupy zaliczamy większość mikroorganizmów wyizolowanych z przypadków bakteriemii, a także *G. desulfuricans*, *G. hirsuta*, *G. aichiensis* [27,38,56]. Spośród patogenów ludzkich *G. otitidis*, *G. sputi* oraz *G. polyisoprenivorans* cechują się zdecydowaną dominacją kwasów mikołowych o 62 atomach węgla, stanowiąc około 50% wszystkich kwasów mikołowych w ich ścianie komórkowej. Potencjalnym markerem *G. bronchialis* jest równy wzajemny stosunek ilościowy C_{60} i C_{62} . Postacią dominującą kwasów mikołowych u *G. terrae* są cząsteczki składające się z 58 atomów węgla [21]. Obserwuje się zatem wyraźne różnice w strukturze kwasów mikołowych ściany komórkowej bakterii patogennych dla człowieka i niepatogennych izolatów środowiskowych. Możliwym zatem wydaje się wyodrębnienie markera lub grupy markerów w postaci kwasów mikołowych, które potencjalnie ujawniałyby przynależność do rodzaju *Gordonia*.

MILLISIA I SKERMANIA

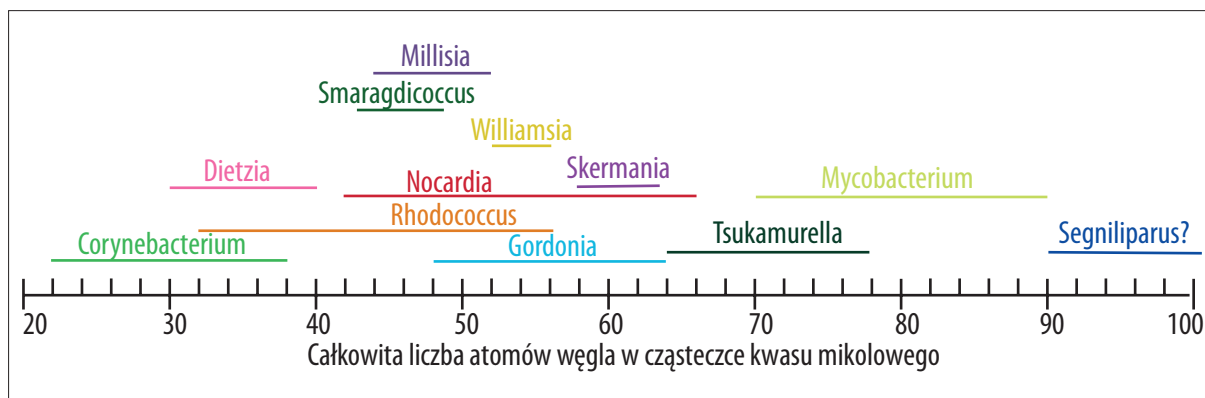
W obrębie rodziny *Nocardiaceae* wyodrębniono dodatkowo dwa oddzielne rodzaje mikroorganizmów: *Millisia* oraz *Skermania*. Kwasy mikołowe tych rodzajów mają długość podobną, co drobnoustroje należące do rodzaju *Gordonia*. *Millisia brevis* charakteryzuje się obecnością w ścianie komórkowej kwasów mikołowych o wielkości 44–52 atomów węgla z dominującą rolą C_{48} , C_{50} oraz C_{52} [50]. Parzysta liczba atomów węgla pozwala na potencjalne rozróżnienie *M. brevis* od *S. niigatensis*, mimo nakładających się zakresów wielkości cząsteczek. Natomiast *Skermania piniformis* zawiera kwasy mikołowe o długości 58–64 atomów węgla cechujące się obecnością jednonienasyconego łańcucha α -alkilowego [11].

WILLIAMISIA

Wśród bakterii z rodzaju *Williamsia* wyodrębnia się obecnie siedem gatunków: *W. deligens*, *W. marianensis*, *W. maris*, *W. muralis* oraz *W. serinedens*. Dotychczas odnotowano przypadki zakażeń u ludzi obejmujące zapalenie płuc oraz gałki ocznej (*W. muralis*), a także jeden przypadek bakteriemii (*W. serinedens*) [12,36,64]. Kwasy mikołowe *W. muralis* zawierają 52–56 atomów węgla, a *W. serinedens* oraz *W. deligens* charakteryzują się obecnością wyłącznie w pełni nasyconych łańcuchów α -alkilowych o długości 16 lub 18 atomów węgla we wzajemnym stosunku ilościowym zbliżonym do 1:1 [23,62,66].

TSUKAMURELLA

Gatunek *Tsukamurella pulmonis* po raz pierwszy wyizolowano z płwociny chorego na gruźlicę płuc w 1996 roku. Obecnie rodzaj ten obejmuje zarówno gatunki izolowane ze środowiska, jak i szczepy klinicznie ważne: *T. inchonensis*, *T. paurometabola*, *T. pseudospumae*, *T. pulmonis*, *T. spongiae*, *T. spumae*, *T. strandjordii*

Ryc. 2. Zróżnicowanie wielkości kwasów mikołowych w obrębie podrzędu *Corynebacterineae*

i *T. tyrosinosolvens*. Wśród głównych zakażeń oportunistycznych u ludzi wywołanych przez te mikroorganizmy wymienia się zakażenia krwi związane z wlewami dożylnymi oraz infekcje dróg oddechowych [6,30,51]. Inne, rzadsze zakażenia obejmują skórę i tkanki miękkie oraz infekcje oka [2,30]. Ściana komórkowa bakterii z rodzaju *Tsukamurella* cechuje się obecnością kwasów mikołowych o liczbie atomów węgla w zakresie 64–76 dla *T. tyrosinosolvens*, *T. spumae* oraz *T. pseudospumae* [65]. Profil kwasów mikołowych *T. spongiae* rozszerza dolny zakres możliwych mas cząsteczkowych do łańcuchów składających się z co najmniej 58 atomów węgla [40]. Profil kwasów mikołowych dla *T. carboxydivorans* całkowicie odstaje od wymienionej charakterystyki cechując się obecnością związków o długości C_{81} – C_{95} . Profil ten zdecydowanie bardziej przystaje do składu kwasów mikołowych rodzaju *Mycobacterium* (ryc. 2) [41].

Wspólnymi cechami kwasów mikołowych *Tsukamurella* jest brak dodatkowych grup funkcyjnych w strukturze nienasyconych łańcuchów meromikołowych, gdzie liczba podwójnych wiązań między atomami węgla może dochodzić do siedmiu. Dodatkowo możliwe jest występowanie w strukturze tych cząsteczek jedynie łańcuchów α -alkilowych o długości 20 lub 22 atomów węgla, całkowicie nasyconych lub mających jedno wiązanie podwójne [65]. Pod względem struktury i długości fragmentu α -alkilowego rodzaj *Tsukamurella* wykazuje duży stopień podobieństwa z prątkami atypowymi z rodzaju *Mycobacterium* z w pełni nasyconymi łańcuchami α -alkilowymi o długości zazwyczaj C_{24} i C_{26} z marginalnym udziałem C_{28} [55]. Mikroorganizmy te mogą być jednak z łatwością rozróżnialne ze względu na wielkość całych cząsteczek kwasów mikołowych, które u prątków kwasoopornych wahają się w granicach 70–90 atomów węgla, stopniu nasycenia łańcuchów meromikołowych oraz obecności postaci metoksy- oraz ketokwasów mikołowych [24].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adachi K., Katsuta A., Matsuda S., Peng X., Misawa N., Shizuri Y., Kroppenstedt R.M., Yokota A., Kasai H.: *Smaragdicooccus niigatensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Corynebacterineae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007; 57: 297-301
- [2] Almeida D.R., Miller D., Alfonso E.C.: *Tsukamurella*: an emerging opportunistic ocular pathogen. Can. J. Ophthalmol., 2010; 45: 290-293
- [3] Anderson R.J.: The chemistry of lipoids of tubercle bacilli. IX. The occurrence of hexacosanic acid in the unsaponifiable wax. J. Biol. Chem., 1929; 85: 351-354
- [4] Asselineau J., Lederer E.: Structure of mycolic acids of *Mycobacteria*. Nature, 1950; 166: 782-783
- [5] Bemer-Melchior P., Haloun A., Riegel P., Drugeon H.B.: Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. Clin. Infect. Dis., 1999; 29: 1338-1340
- [6] Bouza E., Pérez-Parra A., Rosal M., Martín-Rabadán P., Rodríguez-Crèixems M., Marín M.: *Tsukamurella*: a cause of catheter-related bloodstream infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2009; 28: 203-210

SEGNILIPARUS

Rodzaj *Segniliparus* obejmuje obecnie dwa oddzielne gatunki: *Segniliparus rotundus* oraz *Segniliparus rugosus*. Początkowo sklasyfikowane przez CDC (Centers for Disease Control and Prevention) jako trudne do zidentyfikowania szczepy prątków kwasoopornych prawdopodobnie zaangażowane w rozwój mikobakterioz w obrębie dróg oddechowych [8]. Dotychczas dowiedziono infekcji wywołanych przez *Segniliparus* głównie u pacjentów z mukuwiscydozą oraz w jednym przypadku zapalenia płuc u pacjenta z niemukowiscydowym rozstrzeni oskrzeli [10,17,28]. Profil kwasów mikołowych charakterystyczny dla rodzaju *Segniliparus* nie został szczegółowo określony. Wnioskując z czasu retencji w rozdziale HPLC oraz badań TLC, można stwierdzić, że najprawdopodobniej kwasy mikołowe charakterystyczne dla tego rodzaju mają wielkość 90–110 atomów węgla o nierozgałęzionej strukturze i nie zawierają dodatkowych grup funkcyjnych. Pozwoliłoby to łatwo odróżnić te mikroorganizmy od prątków *Mycobacterium*, z którymi łączy ich obecność C_{22} i C_{24} łańcuchów α -alkilowych kwasów mikołowych [8].

PODSUMOWANIE

Mikroorganizmy należące do rzędu *Actinomycetales*, podrzędu *Corynebacterineae* cechują się wysoką różnorodnością pod względem profilu i wielkości cząsteczek kwasów mikołowych, obecności grup funkcyjnych, długości poszczególnych łańcuchów węglowodorowych oraz stopniem nasycenia. Obecne techniki dokładnej analizy chemicznej wykorzystujące spektrometrię mas umożliwiają dostrzec niekiedy subtelne różnice. Pozwoli to na stworzenie łatwej i szybkiej metody chemiotaksonomicznej opierającej się na kwasach mikołowych w obrębie tak złożonej grupy drobnoustrojów o rosnącym znaczeniu klinicznym.



- [7] Brennan P.J., Nikaido H.: The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995; 64: 29–63
- [8] Butler W.R., Floyd M.M., Brown J.M., Toney S.R., Daneshvar M.I., Cooksey R.C., Carr J., Steigerwalt A.G., Charles N.: Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005; 55: 1615–1624
- [9] Butler W.R., Guthertz L.S.: Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001; 14: 704–726
- [10] Butler W.R., Sheils C.A., Brown-Elliott B.A., Charles N., Colin A.A., Gant M.J., Goodill J., Hindman D., Toney S.R., Wallace R.J. Jr, Yakrus M.A.: First isolations of *Segniliparus rugosus* from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 3449–3452
- [11] Chun J., Blackall L.L., Kang S.O., Hah Y.C., Goodfellow M.: A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al. as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997; 47: 127–131
- [12] del Mar Tomas M., Moure R., Saez Nieto J.A., Fojon S., Fernandez A., Diaz M., Villanueva R., Bou G.: *Williamsia muralis* pulmonary infection. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005; 11: 1324–1325
- [13] Donoghue H.D., Lee O.Y., Minnikin D.E., Besra G.S., Taylor J.H., Spigelman M.: *Tuberculosis* in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proc. Biol. Sci.*, 2010; 277: 51–56
- [14] Ete' madi A.H.: The use of pyrolysis gas chromatography and mass spectroscopy in the study of the structure of mycolic acids. *J. Gas. Chromatogr.*, 1967; 5: 447–456
- [15] Glickman M.S.: The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 7844–7849
- [16] Gürtler V., Smith R., Mayall B.C., Pötter-Reinemann G., Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M.: *Nocardia veterana* sp. nov., isolated from human bronchial lavage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001; 51: 933–936
- [17] Hansen T., Van-Kerckhof J., Jelfs P., Wainwright C., Ryan P., Coulter C.: *Segniliparus rugosus* infection, Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009; 15: 611–613
- [18] Hidri N., Farina C., Szponar B., Paściak M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A., Boiron P.: *Nocardia* i nokardiozy. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2001; 69: 677–686
- [19] Hsu F.F., Soehl K., Turk J., Haas A.: Characterization of mycolic acids from the pathogen *Rhodococcus equi* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal. Biochem.*, 2011; 409: 112–122
- [20] Hsu F.F., Wohlmann J., Turk J., Haas A.: Structural definition of trehalose 6-monomycolates and trehalose 6,6'-dimycolates from the pathogen *Rhodococcus equi* by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2011; 22: 2160–2170
- [21] Iida S., Taniguchi H., Kageyama A., Yazawa K., Chibana H., Murata S., Nomura F., Kroppenstedt R.M., Mikami Y.: *Gordonia otitidis* sp. nov., isolated from a patient with external otitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005; 55: 1871–1876
- [22] Johnson J.A., Onderdonk A.B., Cosimi L.A., Yawetz S., Lasker B.A., Bolcen S.J., Brown J.M., Marty F.M.: *Gordonia bronchialis* bacteremia and pleural infection: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.*, 2011; 49: 1662–1666
- [23] Kämpfer P., Andersson M.A., Rainey F.A., Kroppenstedt R.M., Salkinoja-Salonen M.: *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999; 49: 681–687
- [24] Kaneda K., Naito S., Imaizumi S., Yano I., Mizuno S., Tomiyasu I., Baba T., Kusunose E., Kusunose M.: Determination of molecular species composition of C80 or longer-chain alpha-mycolic acids in *Mycobacterium* spp. by gas chromatography-mass spectrometry and mass chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, 1986; 24: 1060–1070
- [25] Kanne J.P., Yandow D.R., Mohammed T.L., Meyer C.A.: CT findings of pulmonary nocardiosis. *AJR. Am. J. Roentgenol.*, 2011; 197: W266–W272
- [26] Kim K.K., Roth A., Andrees S., Lee S.T., Kroppenstedt R.M.: *Nocardia pseudovaccinii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002; 52: 1825–1829
- [27] Klatté S., Rainey F.A., Kroppenstedt R.M.: Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and *Lechevalier 1974* to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994; 44: 769–773
- [28] Koh W.J., Choi G.E., Lee S.H., Park Y.K., Lee N.Y., Shin S.J.: First case of *Segniliparus rotundus* pneumonia in a patient with bronchiectasis. *J. Clin. Microbiol.*, 2011; 49: 3403–3405
- [29] Laval F., Lanéelle M.A., Déon C., Monsarrat B., Daffé M.: Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2001; 73: 4537–4544
- [30] Liu C.Y., Lai C.C., Lee M.R., Lee Y.C., Huang Y.T., Liao C.H., Hsueh P.R.: Clinical characteristics of infections caused by *Tsukamurella* spp. and antimicrobial susceptibilities of the isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2011; 38: 534–537
- [31] Liu J., Barry C.E. III, Besra G.S., Nikaido H.: Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 29545–29551
- [32] Mayilraj S., Suresh K., Kroppenstedt R.M., Saini H.S.: *Dietzia kunjamensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006; 56: 1667–1671
- [33] Mederos L., Valdivia J.A., Valero-Guillén P.L.: Analysis of the structure of mycolic acids of *Mycobacterium simiae* reveals a particular composition of alpha-mycolates in strain 'habana' TMC 5135, considered as immunogenic in tuberculosis and leprosy. *Microbiology*, 2007; 153: 4159–4165
- [34] Minnikin D.E., Alshamaony L., Goodfellow M.: Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia*, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates. *J. Gen. Microbiol.*, 1975; 88: 200–204
- [35] Minnikin D.E., Dobson G., Parlet J.H., Datta A.K., Minnikin S.M., Goodfellow M.: Topics in lipid research: from structural elucidation to biological function. Analysis of mycobacteria mycolic acids. Royal Society of Chemistry, London 1986, 139–143
- [36] Murray R.J., Aravena-Román M., Kämpfer P.: Endophthalmitis due to *Williamsia muralis*. *J. Med. Microbiol.*, 2007; 56: 1410–1412
- [37] Nishiuchi Y., Baba T., Hotta H.H., Yano I.: Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. nova*. *J. Microbiol. Methods.*, 1999; 37: 111–122
- [38] Nishiuchi Y., Baba T., Yano I.: Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol. Methods.*, 2000; 40: 1–9
- [39] Niwa H., Lasker B.A., Hinrikson H.P., Franzen C.G., Steigerwalt A.G., Whitney A.M., Brown J.M.: Characterization of human clinical isolates of *Dietzia* species previously misidentified as *Rhodococcus equi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011; 31: 811–812
- [40] Olson J.B., Harmody D.K., Bej A.K., McCarthy P.J.: *Tsukamurella spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deep-water marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007; 57: 1478–1481
- [41] Park S.W., Kim S.M., Park S.T., Kim Y.M.: *Tsukamurella carboxydvorans* sp. nov., a carbon monoxide-oxidizing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009; 59: 1541–1544
- [42] Paściak M., Mordarska H., Szponar B., Gamian A.: Metody chemiotaksonomiczne w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez aktynobakterie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 403–412
- [43] Pignone M., Greth K.M., Cooper J., Emerson D., Tang J.: Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 1963–1970
- [44] Pilares L., Agüero J., Vázquez-Boland J.A., Martínez-Martínez L., Navas J.: Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48: 1904–1907
- [45] Rafidinarivo E., Lanéelle M.A., Montrozier H., Valero-Guillén P., Astola J., Luquin M., Promé J.C., Daffé M.: Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. *J. Lipid Res.*, 2009; 50: 477–490
- [46] Rainey F.A., Klatté S., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E.: *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995; 45: 32–36
- [47] Reyes G., Navarro J.L., Gamallo C., delas Cuevas M.C.: Type A aortic dissection associated with *Dietzia maris*. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2006; 5: 666–668
- [48] Saleeb P.G., Drake S.K., Murray P.R., Zelazny A.M.: Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2011; 49: 1790–1794

- [49] Salvadó-Viader J.M., Molina-Torres C.A., Guerrero-Olazarán M.: Detection and identification of mycobacteria by mycolic acid analysis of sputum specimens and young cultures. *J. Microbiol. Methods*, 2007; 70: 479–483
- [50] Savini V., Fazii P., Favaro M., Astolfi D., Poliilli E., Pompilio A., Vannucci M., D'Amario C., Di Bonaventura G., Fontana C., D'Antonio D.: Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Gordonia*. *Microbes. Infect.*, 2011; 14: 401–410
- [51] Schwartz M.A., Tabet S.R., Collier A.C., Wallis C.K., Carlson L.C., Nguyen T.T., Kattar M.M., Coyle M.B.: Central venous catheter-related bacteremia due to *Tsukamurella* species in the immunocompromised host: a case series and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 35: e72–e77
- [52] Shui G., Bendt A.K., Jappan I.A., Lim H.M., Laneelle M., Hervé M., Via L.E., Chua G.H., Bratschi M.W., Rahim S.Z., Michelle A.L., Hwang S.H., Lee J.S., Eum S.Y., Kwak H.K., Daffé M., Dartois V., Michel G., Barry C.E. III, Wenk M.R.: Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice. *EMBO Mol. Med.*, 2012; 4: 27–37
- [53] Soddell J.A., Stainsby F.M., Eales K.L., Kroppenstedt R.M., Seviour R.J., Goodfellow M.: *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006; 56: 739–744
- [54] Sokolovská I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P.: Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* 9. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69: 7019–7027
- [55] Song S.H., Park K.U., Lee J.H., Kim E.C., Kim J.Q., Song J.: Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. *J. Microbiol. Methods*, 2009; 77: 165–177
- [56] Stratton H.M., Brooks P.R., Seviour R.J.: Analysis of the structural diversity of mycolic acids of *Rhodococcus* and *Gordonia* [correction of *Gordonia*] isolates from activated sludge foams by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry (SIM GC-MS). *J. Microbiol. Methods*, 1999; 35: 53–63
- [57] Takayama K., Wang C., Besra G.S.: Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005; 18: 81–101
- [58] Tindall B.J., Euzéby J.P.: A taxonomic note on the authorship and date of valid publication of *Rhodococcus sputi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001; 51: 255–256
- [59] Uenishi Y., Takii T., Yano I., Sunagawa M.: Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, 2009; 77: 320–322
- [60] Viader-Salvadó J.M., Molina-Torres C.A., Guerrero-Olazarán M.: Detection and identification of mycobacteria by mycolic acid analysis of sputum specimens and young cultures. *J. Microbiol. Methods*, 2007; 70: 479–483
- [61] Watanabe M., Aoyagi Y., Ridell M., Minnikin D.E.: Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. *Microbiology*, 2001; 147: 1825–1837
- [62] Yassin A.F., Hupfer H.: *Williamsia deligens* sp. nov., isolated from human blood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006; 56: 193–197
- [63] Yassin A.F., Hupfer H., Schaal K.P.: *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006; 56: 641–645
- [64] Yassin A.F., Lombardi S.J., Fortunato S.J., McNabb P.C., Carr M.B., Trabue C.H.: Perinatal sepsis caused by *Williamsia serinedens* infection in a 31-year-old pregnant woman. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48: 2626–2629
- [65] Yassin A.F., Rainey F.A., Brzezinka H., Burghardt J., Rifai M., Seifert P., Feldmann K., Schaal K.P.: *Tsukamurella pulmonis* sp. nov. *Microbiol Immunol.*, 1996; 40: 1–4
- [66] Yassin A.F., Young C.C., Lai W.A., Hupfer H., Arun A.B., Shen F.T., Rekha P.D., Ho M.J.: *Williamsia serinedens* sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2007; 57: 558–561
- [67] Yoon J.H., Kang S.S., Cho Y.G., Lee S.T., Kho Y.H., Kim C.J., Park Y.H.: *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000; 6: 2173–2180
- [68] Yu X., Han F., Wu J., He Q., Peng W., Wang Y., Huang H., Li H., Wang R., Chen J.: *Nocardia* infection in kidney transplant recipients: case report and analysis of 66 published cases. *Transpl. Infect. Dis.*, 2011; 13: 385–391
- [69] Zhang Y.Q., Li W.J., Kroppenstedt R.M., Kim C.J., Chen G.Z., Park D.J., Xu L.H., Jiang C.L.: *Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005; 55: 1133–1137

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

