

Received: 2007.04.05  
Accepted: 2007.06.05  
Published: 2007.06.14

## Metody chemiotaksonomiczne w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez aktynobakterie\*

Chemotaxonomical methods in the diagnostics of clinical strains causing actinobacterial infections

Mariola Paściak, Halina Mordarska, Bogumiła Szponar, Andrzej Gamian

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

### Streszczenie

Aktynobakterie, organizmy w większości saprofityczne, bywają nierozpoznawane bądź mylnie rozpoznawane w szerzących się ostatnio zakażeniach oportunistycznych, związanych z dysfunkcją układu odpornościowego. W artykule omówiono metody chemiczne stosowane w kompleksowej diagnostyce tych drobnoustrojów opartej na analizie strukturalnych składników osłon komórkowych o charakterze markerów taksonomicznych. Należą do nich aminokwasy peptydoglikanu, cukry, kwasy tłuszczowe oraz lipidy diagnostycznie ważne, a wśród nich fosfolipidy i glikolipidy. Chemiotaksonomia promieniowców jest komplementarna względem metod opartych na analizie podjednostki 16S rRNA i innych metod genotaksonomicznych, stosowanych w niektórych laboratoriach mikrobiologicznych, zwłaszcza referencyjnych, w celu uniknięcia lub zminimalizowania błędów w identyfikacji i terapii aktynomicetoz.

Słowa kluczowe:

aktynobakterie • promieniowce • markery chemiotaksonomiczne • TLC • GLC-MS • diagnostyka laboratoryjna

### Summary

The application of polyphasic taxonomic studies to identify several strains of *Actinobacteria* is presented. These microorganisms cause opportunistic infections relatively often (especially in immunocompromised patients), but their proper classification is difficult and they may be mistaken with other similar taxa. The article involves some clinical isolates properly identified by extended analysis, including simplified chromatographic methods (TLC, GLC). These procedures helped to establish a chemotaxonomic profile based on the well-grounded detection of chemical compounds of the bacterial cell envelope. Several components are useful taxonomic markers: the main amino acids of murein, sugars, and fatty acids and polar lipids, mainly phospholipids and glycolipids. The chemotaxonomy of *Actinobacteria* is a part of the contemporary classification of these microorganisms and should be applied in reference laboratories to avoid or minimize diagnostic and therapeutic error.

Key words:

actinobacteria • actinomycetes • chemotaxonomic markers • TLC • GLC-MS • reference laboratory diagnostics

\* Praca częściowo finansowana z projektu badawczego 3 PO5A 007 23 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10566.pdf">http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10566.pdf</a>
<b>Word count:</b>	3334
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	7
<b>References:</b>	38

**Adres autorki:** dr Mariola Paściak, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: pasciak@iitd.pan.wroc.pl

Aktynobakterie, organizmy w większości saprofityczne, bytujące głównie w środowisku glebowym, są czynnikiem etiologicznym zakażeń oportunistycznych u pacjentów z immunosupresją lub dysfunkcją układu odpornościowego. Do grupy tej należą groźne patogeny inwazyjne, m.in. z rodzajów *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia* i *Tsukamurella*. Wśród względnych patogenów oportunistycznych wyróżnia się *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Nocardia*, *Rothia* oraz liczne bakterie koryno-, aktynomiceto-, nocardio- i mikobakteriopodobne, charakteryzujące się szczególną skłonnością do atakowania płuc i mózgu.

Nasze laboratorium aktywnie uczestniczy w Europejskim Programie Epidemiologii Nocardioz i innych chorób wywołanych przez promieniowce, zwanych ogólnie aktynomicetozami. W ramach tego programu rejestruje się przypadki nocardioz oraz infekcji nocardiozopodobnych i określa częstość ich występowania [9, 18]. Istotne jest też usprawnienie diagnostyki oraz ustalanie trudności w identyfikacji czynnika etiologicznego. Prawidłowe i wczesne rozpoznanie stanowi podstawę skutecznej terapii tych zakażeń, często nierozpoznawanych bądź błędnie diagnozowanych.

Tradycyjna nazwa „promieniowce” odnosi się do klasy aktynobakterii (*Actinobacteria*), która pojawiła się w systemie hierarchicznej klasyfikacji drobnoustrojów w 1997 roku. Poszczególne taksony przyporządkowano na podstawie sekwencji 16S rDNA/rRNA, która odzwierciedla pokrewieństwo filogenetyczne mikroorganizmów [33]. Współczesna charakterystyka aktynobakterii obejmuje:

1. Określenie podobieństwa sekwencji 16S rDNA/rRNA, zróżnicowanej wśród szczepów na różnym poziomie pokrewieństwa.
2. Hybrydyzację DNA-DNA, wykazującą stopień podobieństwa między pojedynczymi nićmi DNA szczepów reprezentujących pokrewne gatunki.
3. Analizę chemiotaksonomiczną, wykrywającą różnice w składzie komórkowym, z uwzględnieniem peptydoglikanu, kwasów tłuszczowych, lipidów polarnych (fosfo- i glikolipidów), chinonów izoprenowych, cytochromów i procentowej zawartości zasad G+C w DNA (% GC).

Ta wielofazowa strategia w klasyfikacji drobnoustrojów wiąże się ściśle z ustaleniem etiologii zakażeń oportunistycznych. Przeprowadzenie skutecznej diagnostyki klinicznych szczepów aktynobakterii [23] wymaga kompleksowego zastosowania metod trudnych do standaryzacji, stąd wykonywane jest na ogół w laboratoriach referencyjnych. Polecamy jednak ich wprowadzenie do laboratoriów diagnostycznych, zwłaszcza w formie uproszczonej, ogra-

niczoney do analizy markerów chemiotaksonomicznych, z wykorzystaniem niewielkiej ilości biomasy komórkowej i z użyciem dostępnej aparatury laboratoryjnej.

W artykule przedstawiono techniki chemiotaksonomiczne stosowane w diagnostyce izolatów wstępnie zidentyfikowanych jako aktynobakterie. Przegląd metod zilustrowano na przykładach szczepów, wśród których znalazły się powszechne, a także mniej znane rodzaje promieniowców, odpowiedzialne za narastającą liczbę zakażeń oportunistycznych. Infekcje wywołane przez drobnoustroje obszernej klasy *Actinobacteria* od lat sprawiają trudności klasyfikacyjne i są przyczyną pomyłek diagnostycznych i terapeutycznych. Kompleksowa diagnostyka aktynobakterii pozwala uniknąć tych błędów.

#### POSTĘPOWANIE Z MATERIAŁEM KLINICZNYM, IZOLACJA SZCZEPÓW, IDENTYFIKACJA KLASYCZNA I CHEMIOTAKSONOMICZNA

Otrzymany materiał po obserwacji makro- i mikroskopowej wysiewa się na stosowne podłoża wzbogacone, płynne i stałe. Aktynobakterie mają duże wymagania odżywcze, toteż poleca się przede wszystkim podłoże z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI), często wzbogacone 5% dodatkami surowicy cielęcej, podłoże tioglikolanowo-sojowe (TS), podłoże „79” – z wyciągiem drożdżowym i glukozą [19] oraz podłoże Sabourauda. Hodowle podpowierzchniowe i stacjonarne należy inkubować przez 2–7 dni w warunkach tlenowych i mikroaerofilnych (w obecności CO<sub>2</sub>), bądź 7–28 dni w warunkach beztlenowych (np. w systemach GasPak) w temp. 37°C.

#### WSTĘPNE BADANIA IZOLATÓW KLINICZNYCH

Morfologię kolonii i komórek określa się za pomocą klasycznych metod mikroskopowych i makroskopowych, obserwując charakterystyczne cechy promieniowców: występowanie pseudogrybni powietrznej i pseudospor oraz obecność polimorficznych, rozgałęzionych komórek w obrazie mikroskopowym. Stosuje się także testy fizjologiczno-biochemiczne, różnicujące rodzajowe i/lub gatunkowe właściwości fenotypowe szczepów. Szeroko stosowany jest test API Coryne (bioMérieux).

#### STANDARYZOWANE WARUNKI OTRZYMANIA MASY BAKTERYJNEJ

Szczepy izolowane z materiału klinicznego posiewa się na wzbogacone pożywki płynne, uwzględniając wymagania hodowlane izolatów. Szczepy tlenowe namnaża się przez 48 h w hodowli podpowierzchniowej, używając medium 79 z wyciągiem drożdżowym i glukozą [19]. Szczepy mikroaerofilne lub beztlenowe inkubuje się w warunkach stacjonarnych, odpowiednio w po-



żywece BHI z dodatkiem (lub bez) 5% surowicy cielęcej, lub w pożywce TS przez 5–7 dni [12]. Czystość hodowli sprawdza się w preparatach bezpośrednich barwionych metodą Grama i w posiewach na podłożu BHI lub agarowym z dodatkiem krwi baraniej (5%). Namnożoną masę bakteryjną po zabiciu w temp. 100°C i odwirowaniu (20 min, 4000 obr./min) przemywa się roztworem soli fizjologicznej (3×). Część masy liofilizuje się, a część zamraża w temp. –20°C [15].

Wstępna charakterystyka czynnika etiologicznego ukierunkowuje dalsze postępowanie oparte na analizie chemiotaksonomicznej, która polega na badaniu składników chemicznych komórki bakteryjnej i obejmuje:

- markery lipidowe osłon komórkowych, w tym kwasy tłuszczowe oraz lipidy polarne, tj. fosfolipidy [15, 16] i glikolipidy [19];
- diaminowe aminokwasy peptydoglikanu i cukry diagnostycznie ważne, określające typ ściany komórkowej;
- menachinony [2].

#### ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W METANOLIZATACH KOMÓRKOWYCH

Podstawowym badaniem chemiotaksonomicznym aktywności bakterii jest określenie profilu kwasów tłuszczowych, analizowanych w postaci estrów metylowych za pomocą chromatografii gazowej [11]. Należą do nich kwasy tłuszczowe proste i rozgałęzione (izo i anteizo) oraz kwas tuberkulo-stearynowy (10-metylostearynowy).

Suchą masę bakteryjną (2 mg) poddaje się metanolizie (metanolew roztwór 4M HCl<sup>1</sup>, 1ml, temp. 100°C, 1h), następnie ekstrahuje (2×) mieszaniną heksan-woda (1:1, v/v). Fazę organiczną, zawierającą estry metylowe kwasów tłuszczowych, odparowuje się pod strumieniem azotu i analizuje za pomocą GC lub GLC-MS.

Wśród kwasów tłuszczowych szczególną grupę stanowią kwasy mikołowe występujące w rodzajach: *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella* i *Mycobacterium*. Są to związki zawierające 30–90 atomów węgla, α-rozgałęzione, β-hydroksylowe. Najkrótsze łańcuchy występują w komórkach *Corynebacterium*, a najdłuższe u *Mycobacterium*, gdzie odpowiadają za kwasooporność komórek. Większość z nich jest estrowo związana z arabinogalaktanem, wchodzącym w skład osłon komórkowych, aczkolwiek niektóre występują w komórce w stanie wolnym.

Kwasy mikołowe, przy braku złożonej aparatury [5], analizuje się prostszą metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), w postaci wolnych związków lipidowych, znanych jako LCN-A (lipid characteristic for *Nocardia*) [20,21].

Suchą masę bakteryjną (50 mg) ekstrahuje się (2×) mieszaniną etanol-eter dietylowy (1:1, v/v), delikatnie wytrząsając przez 5–7 h w szczelnie zamkniętych probówkach w temp. 35°C. Połączone ekstrakty suszy się pod strumieniem azotu i rozwija na płytkach TLC (silica gel 60, Merck) w układzie

eter naftowy (temp. wrz. 60°C)-eter dietylowy-kwas octowy lod. (85:15:1, v/v/v) lub heksan-eter dietylowy-kwas octowy lod. (70:30:1, v/v/v) [20]. Chromatogram wywołuje się w komorze wypełnionej parami jodu (5 min), przez spryskanie 20% wodnym roztworem siarczanu amonu, bądź 10% roztworem kwasu fosfomolibdenowego w etanolu i ogrzewanie w temp. 180–200°C do wystąpienia plam. Wolne kwasy mikołowe są łatwe do wykazania ze względu na obecność wiązań nienasyconych i niewielką względem startu ruchliwość chromatograficzną.

Całkowite kwasy mikołowe, tj. wolne i związane, można wykryć za pomocą TLC w metanolizatach suchej masy bakteryjnej [5] lub w postaci estrów *para*-bromofenacylowych za pomocą HPLC [1].

#### ANALIZA LIPIDÓW POLARNYCH W SUROWYCH EKSTRAKTACH KOMÓRKOWYCH ZA POMOCĄ TLC

Do chemiotaksonomicznej charakterystyki promieniowców wykorzystuje się również fosfolipidy i glikolipidy. Szybka i prosta analiza TLC umożliwiła wykazanie istotnych taksonomicznie glikolipidów głównych w ekstraktach lipidowych masy komórkowej m.in. dla drobnoustrojów z rodzajów *Saccharopolyspora*, *Rothia*, *Propionibacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* [7,22,24,26,27,35]. Z kolei zakwalifikowanie szczepu do jednego z pięciu typów fosfolipidowych ułatwia jego identyfikację (tabela 1).

Ubitą biomasa bakteryjną (500 mg) wytrząsa się przez 3 godz. (2×), w mieszaninie chloroform-metanol (2:1, v/v) w temp. pokojowej. Połączone ekstrakty odparowuje się na wyparce próżniowej i po rozpuszczeniu w chloroformie przenosi w stężeniu 50 mg/ml do małych, szczególnie zakreconych probówek z przeznaczeniem do analizy fosfolipidów [15] i glikolipidów [19]. W tym celu na dwie płytki pokryte żelazem krzemionkowym 60 (Merck) należy nanieść próbki (2 µl) i rozwijać (jednocześnie) w mieszaninie chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v/v); po wysuszeniu jedną z płytek spryskać odczynnikami molibdenowym Dittmera i Lestera [4], do wystąpienia plam w temp. pokojowej, a drugą po – uprzednim spryskaniu 0,5% orcynelem w etanolu – pozostawić kilka minut w temp. 180°C.

Wyniki należy porównywać ze standardami fosfolipidów oraz z ekstraktami chloroformowo-metanolewymi wzorcowych szczepów bakterii zawierających glikolipidy o wartości taksonomicznej.

#### ANALIZA CUKRÓW W HYDROLIZATACH KOMÓRKOWYCH

W taksonomii wykorzystuje się cukry budujące ścianę komórkową lub występujące w cytosolu. W hydrolizatach całych komórek oznacza się m.in. arabinozę, galaktozę, ramnozę i madurozę. Arabinoza i galaktoza jest markerem arabinogalaktanu, makrocząsteczki występującej w ścianie komórkowej przedstawicieli rodzajów *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* i *Dietzia*. Maduroza jest cukrem charakte-

<sup>1</sup> Przygotowanie 4M HCl w metanolu: do schłodzonego metanolu (22 ml) ostrożnie dodać kroplami chlorek acetylu (10 ml). Reakcję przeprowadzić pod wyciągiem, na lodzie, z użyciem szklanej pipety pasteurowskiej. **Uwaga** – reakcja silnie egzotermiczna.

Tabela 1. Charakterystyka szczepów aktynobakterii klinicznie ważnych z uwzględnieniem pomocniczych cech fenotypowych i markerów chemiotaksonomicznych

	<i>Actinomyces</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Rothia</i>	<i>Streptomyces</i>
<b>Morfologia komórki</b>							
nitkowate, rozgałęzione	-	-	-	+	-	-	+
dyfteroidalne, niekiedy rozgałęzione	+	-	-	-	+	-	-
pleomorficzne: od nitkowatych do kulistych (w parach, tetradach i nieregularnych skupiskach)	-	+	+	-	-	+	-
<b>Morfologia kolonii</b>							
gładkie i/lub szorstkie	+	+	+	-	+	+	-
ziarniste i/lub nieregularne	-	-	+	+	-	-	+
grzybnia powietrzna	-	-	-	+/-	-	-	+
<b>Cechy fizjologiczno-biochemiczne</b>							
Barwienie metodą Grama	+	+	+	+	+/-	+	+
Kwasooporność	-	-	-	+/-	-	-	-
Katalaza	- (+) <sup>a</sup>	+	+	+	+ (-) <sup>b</sup>	+ (+/-) <sup>c,d</sup>	+
Hydrolyza: eskuliny	Z	+	-	+	- (+)	+	+
kazeiny	- (+)	Z	- (+)	-	+	-	+
skrobi	Z	Z	+	-	+	-	+
Hemoliza	-	-	-	+ (-)	- (+)	-	+
Wrażliwość na chemioterapeutyki (w tym antybiotyki)	β-laktamowe, polipeptydowe i inne <sup>e</sup>	ceftriakson, chloramfenikol, ryfampicyna, tetracyklina <sup>f</sup>	aminoglikozydowe, β-laktamowe, polipeptydowe, makrolidy i inne <sup>g</sup>	sulfonamidy, aminoglikozydy, tetracykliny <sup>h</sup>	β-laktamowe, makrolidy i inne <sup>i</sup>	β-laktamowe, makrolidy <sup>j</sup>	aminoglikozydowe, polipeptydowe <sup>k</sup>
<b>Markery chemiczne</b>							
a) wykazane w hydrolizatach i/lub w ekstraktach całych komórek							
mezo-DAP	-	-	-	+	- (+)	-	-
LL-DAP	-	-	-	-	+ (-)	-	+
Arabinoza (Ara)	-	-	BD	+	-	-	-
Galaktoza (Gal)	Z	+	BD	+	+	+	-
Kwasy tłuszczowe: mikołowe	-	-	-	+	-	-	-
izo, anteizo	-	+	+	-	+	+	+
tuberkulostearynowy	-	-	-	+	-	-	-
Typ fosfolipidowy <sup>l</sup>	PIII	PI	PI	PII	PI	PI	PII
Wzorzec glikolipidowy <sup>m</sup>	g	G	G	g i/lub G	G i/lub g	G	g



Tabela 1 (c.d.). Charakterystyka szczepów aktywnobakterii klinicznie ważnych z uwzględnieniem pomocniczych cech fenotypowych i markerów chemiotaksonomicznych

	<i>Actinomyces</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Rothia</i>	<i>Streptomyces</i>
b) wykazane w hydrolizatach ściany komórkowej							
Lizyna (Lys)	+ (-)	+	+	-	-	+	-
Ornityna (Orn)	+ (-)	-	-	-	-	-	-
Glicyna (Gly)	-	-	Z <sup>n</sup>	-	+	-	+
Typ ściany komórkowej <sup>p</sup>	V Lys, Orn VI Lys, Asp (Gal) <sup>z</sup>	VI Lys (Asp, Gly) <sup>z</sup>	VI Lys (Asp, Gly) <sup>z</sup>	IV mezo-DAP Ara, Gal	I LL-DAP, II mezo-DAP, Gly	VI Lys, Asp Gal	I LL-DAP
GC (mol %) <sup>r</sup>	55–69	59–70	66–73	64–72	57–68	47–53	69–78

Z – zmiennie w obrębie rodzaju; BD – brak danych;

<sup>a-c</sup> wynik reakcji (+) bądź (-) dotyczy odpowiednio większości lub mniejszości szczepów w obrębie poszczególnych gatunków danego rodzaju, zaś +/- świadczy o słabej reakcji; wyjątek stanowią *A. viscosus*, *P. propionicum* i *R. mucilaginosa* reagujące odmiennie (w 100%) od innych pokrewnych gatunków;

<sup>d</sup> cecha uzależniona od czasu pozostawienia koloni w atmosferze powietrza;

<sup>e</sup> w tym penicylina i jej pochodne, oraz inne m. in.: erytromycyna, klindamycyna, chloramfenikol, erytromycyna, linkomycyna; streptomycyna, wankomycyna [30];

<sup>f</sup> *A. scleromae*: ceftriakson, chloramfenikol, ryfamycyna, tetracyklina [10];

<sup>g</sup> w tym kanamycyna, neomycyna, streptomycyna; penicylina, metycylina; erytromycyna; polimyksyna B, wankomycyna; chloramfenikol, nowobiocyna, tetracyklina [31];

<sup>h</sup> w tym TMP-SMX (trimetoprim z sulfametoksazolem), sulfadiazyna, amikacyna z imipenem, gentamycyna, minocyklina oraz inne [9];

<sup>i</sup> w tym penicyliny i cefalosporyny, erytromycyna, linkomycyna, klindamycyna oraz inne [28];

<sup>j</sup> w tym penicylina i jej analogi oraz erytromycyna [36];

<sup>k</sup> w tym gentamycyna, neomycyna, tobramycyna i wankomycyna [17];

<sup>l</sup> typ fosfolipidowy: PI (brak fosfolipidów głównych), PII markerem fosfolipidowym jest fosfatydyloetanolamina (PE), PIII markerem fosfolipidowym jest fosfatydylocholina (PC) [16];

<sup>m</sup> wzorzec glikolipidowy: G – glikolipidy główne, g – brak glikolipidów głównych [19];

<sup>n</sup> [37];

<sup>p</sup> [15];

<sup>r</sup> [6, 31].

rystycznym dla *Actinomadura madurae*, patogenu wywołującego tzw. stopę madurską u mieszkańców krajów tropikalnych.

Suchą masę bakteryjną (5 mg) hydrolizuje się w probówce typu Pyrex w 1 M HCl przez 4 godz. w temp. 100°C, a następnie odparowuje się pod strumieniem azotu płuczając kolejno wodą i metanolem. Hydrolizat rozpuszczony w wodzie (1 ml) redukuje się za pomocą borowodoru sodu (NaBH<sub>4</sub>, 3 mg) przez 16 godz. w temp. 4°C. Nadmiar odczynnika rozkłada się przez dodanie kwasu octowego i kilkakrotne odparowywanie z metanolem na wyparce próżniowej. Reakcję acetylacji przeprowadza się dodając do suchej próbki po 300 µl bezwodnika kwasu octowego i pirydyny, pozostawiając całość przez 40 min w temp. 100°C. Reagenty usuwa się przez kilkakrotne odparowanie z toluenem, po czym próbkę ekstrahuje się w układzie chloroform-woda (1:1, v/v) [29]. Oddzieloną fazę organiczną odparowuje się do sucha pod strumieniem azotu, a następnie rozpuszcza w octanie etylu. Analizę cukrową octanów alditoli przeprowadza się za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej z detekcją masową (GLC-MS).

#### WYKRYWANIE IZOMERÓW KWASU DIAMINOPIMELINOWEGO (DAP) W HYDROLIZATACH KOMÓRKOWYCH

Wykrycie w hydrolizatach komórkowych kwasu mezo- lub LL-diaminopimelinowego, aminokwasu występującego w mostku peptydowym ściany komórkowej pozwala na identyfikację licznych aktywnobakterii. Zaletą testu jest wykorzystanie biomasy komórkowej z pominięciem skomplikowanej i czasochłonnej izolacji osłon komórkowych.

Suchą masę bakteryjną (1–5 mg) w probówce typu Pyrex poddaje się kwaśnej hydrolizie w 6M HCl (1 ml) w temp. 100°C przez 18 godz. Hydrolizat zobojętnia się przepłukując przemiennie wodą dejonizowaną i metanolem, i odparowuje się pod strumieniem azotu [34]. Chromatografię cienkowarstwową próbek i standardów LL- i mezo-DAP, rozpuszczonych w wodzie wykonuje się na płytkach celulozowych (Merck) w układzie rozwijającym: metanol-pirydyna-10M HCl-woda (80:10:2,5:17,5 v/v/v/v). Chromatogram wywołuje się przez spryskanie 0,1% roztworem ninhydryny w acetonie i wysuszenie w temp. 100–110°C [34].



Izomery DAP charakteryzują się mniejszą ruchliwością chromatograficzną niż pozostałe aminokwasy i mają charakterystyczną oliwkowo-zieloną barwę.

Oprócz DAP, który jest dość powszechnie występującym aminokwasem diaminowym w 3 pozycji mostka peptydowego, taksonomiczne znaczenie mają też lizyna, ornityna oraz kwas diaminomasłowy [8]. Analiza tych aminokwasów związana jest jednak z preparacją ściany komórkowej.

#### **IZOLACJA I OCZYSZCZANIE BAKTERYJNEJ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ**

Procedura ta służy do pełnej analizy peptydoglikanu pod względem składu aminokwasowo-cukrowego.

Ubitą masę bakteryjną (ok. 10 g), zawieszoną w 1M buforze fosforanowym, pH 8,0 (1 g/3 ml), zamraża się i rozbija za pomocą prasy ciśnieniowej (AB-BIOX) i dezintegratora ultradźwiękowego (2×10 min). Komórki nierozbite oddziela się przez wirowanie (5 min, 3000 obr./min), a nadśącz wiruje ponownie (17 500 obr./min). Osad surowych ścian komórkowych przemywa się dwukrotnie 95% etanolem, a następnie dodaje 2% KOH w 95% etanolu (10 ml/1g wyjściowej masy bakteryjnej) i wytrząsa 3 doby w temp. 37°C. Osad przepłukuje<sup>2</sup> się dwukrotnie 95% etanolem, wodą i buforem fosforanowym, a po dodaniu buforowanego roztworu trypsyny (3 mg/1ml buforu fosforanowego) wytrząsa przez 2 godz. w temp. 37°C. Przepłukany ponownie (2×) osad ścian (bufor fosforanowy, woda i 0,02M HCl) traktuje się roztworem pepsyny (3 mg/1 ml 0,02 M HCl) i wytrząsa przez 16 godz. w temp. 37°C. Po dwukrotnym przemyciu 0,02 M HCl, wodą, 95% etanolem i jednorazowo chloroformem, osad oczyszczonych ścian komórkowych pozostawia się do wyschnięcia w temp. pokojowej lub liofilizuje się [15].

#### **WYKRYWANIE AMINOKWASÓW I CUKRÓW W HYDROLIZATACH ŚCIANY KOMÓRKOWEJ ZA POMOCĄ TLC I GLC-MS**

Oznaczanie składu aminokwasowego i cukrowego peptydoglikanu aktynobakterii umożliwia określenie typu ściany komórkowej i ułatwia identyfikację badanego szczepu.

Oczyszczoną ścianę komórkową (2 mg) poddaje się kwaśnej hydrolizie za pomocą 4M HCl (1 ml) przez 16 godz. w temp. 100°C. Próbkę odparowuje się pod strumieniem azotu, i po przepłukaniu kolejno wodą i metanolem zawiesza w wodzie (0,5 ml), sączy przez filtr z waty szklanej, odparowuje pod strumieniem azotu i pozostawia w eksykatorze nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> do całkowitego wyschnięcia. Chromatografię cienkowarstwową (TLC) próbki wraz ze standardami aminokwasów, rozpuszczonymi w wodzie wykonuje się na płytkach celulozowych (Merck) w układzie rozwijającym: metanol-pirydyna-10M HCl-woda (80:10:2,5:17,5 v/v/v/v). Chromatogram wywołuje się przez spryskanie 0,1% roztworem ninhydriny w acetonie i wysuszenie w temp. 100–110°C [15].

Aminokwasy uwolnione w wyniku hydrolizy ściany komórkowej można też przeprowadzić w chiralne pochodne i analizować izomery D i L za pomocą GLC-MS. W tym celu używany jw. hydrolizat, po dodaniu R(-)-2-butanolu (200 µl)

i chlorku acetylu (20 µl), pozostawia się w temp. 120°C przez 20 min, po czym odparowuje pod strumieniem azotu; następnie dodaje się octan etylu (120 µl), bezwodnik kwasu heptafluorobutyrylowego (40 µl) (Sigma) i po przeprowadzeniu reakcji w temp. 150°C przez 5 min, ponownie odparowuje. Otrzymane N(O)-heptafluoro-izobutyrylobutylowe estry aminokwasów analizuje się za pomocą GLC-MS.

Cukry ściany komórkowej oznacza się taką samą metodą jak w hydrolizatach komórkowych [29] z wykorzystaniem GLC-MS, używając mniejszą ilość próbki (0,5–1 mg).

#### **ZASTOSOWANIE METOD CHEMIOTAKSONOMICZNYCH W KOMPLEKSOWEJ DIAGNOSTYCE AKTYNOBAKTERII**

Wykorzystanie analizy chemiotaksonomicznej w rozpoznawaniu czynnika etiologicznego infekcji aktynomikotycznych przedstawiono na przykładzie kilku izolatów klinicznych. Zestawione w tabeli 1 wyniki analizy taksonomicznej badanych szczepów odpowiadają w pełni typowym przedstawicielom rodzajów, które reprezentują i potwierdzają ich tożsamość. Wyniki omówiono z uzasadnieniem procedury wykorzystanej dla poszczególnych szczepów.

##### ***Propionibacterium* sp.**

Szczep *Propionibacterium* sp. wyizolowano ze zropiałego kaszaka okolicy szyjno-twarzowej od pacjenta z podejrzeniem promienicy (szczep nr 1). W preparatach mikroskopowych z 7-dobowej, mikroaerofilnej hodowli materiału ropnego, inkubowanego w warunkach stacjonarnych na podłożu tioglikolanowo-sojowym, obserwowano polimorficzne pałeczki promieniowcopodobne, barwiące się zmiennie metodą Grama. Szczep ten rozpoznany za pomocą testu API 20A jako *Actinomyces meyeri* lub *A. israelii*, okazał się błędnie sklasyfikowany już na poziomie rodzaju.

Badania chemiotaksonomiczne wykazały, że jest on przedstawicielem rodzaju *Propionibacterium*. Najważniejszym tego dowodem było wykazanie w hydrolizatach całych komórek kwasu LL-diaminopimelinowego (LL-DAP) (ryc. 1), charakterystycznego dla mikroorganizmów mających I typ ściany komórkowej, nie zaś V czy VI, przynależny rodzajowi *Actinomyces*.

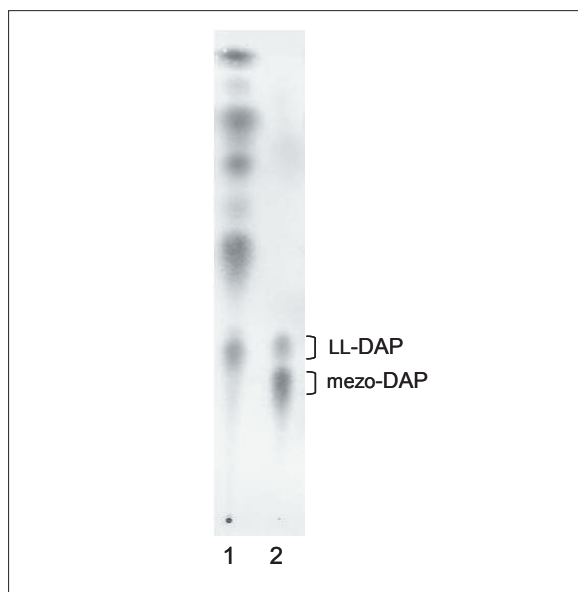
Ogólny profil chemiotaksonomiczny izolatu był również charakterystyczny dla *Propionibacterium*, tj. pozbawiony cukrów diagnostycznie ważnych zawierał rozgałęzione *izo* i *anteizo* kwasy tłuszczowe nieobecne w komórkach *Actinomyces*, oraz lipidy polarne typu fosfolipidowego I (pierwszego) i glikolipidy (g) – bez znaczenia taksonomicznego. Analiza kompleksowa badanego szczepu w pełni uzasadnia jego identyfikację jako *Propionibacterium* sp.

##### ***Actinomyces viscosus***

Drobnoustrój wyizolowano z mięśniaka macicy; wstępna diagnoza wskazywała na aktynomikozę (szczep nr 2). Identyfikacja za pomocą zestawu komercyjnego VITEK (bioMérieux) wykazała *Actinomyces viscosus* lub *A. naeslundii*. Szczep rozwijał się bardzo powoli na podłożu

<sup>2</sup> Płukanie wykonuje się dodając wielokrotnie większej objętości roztworu płuczającego w stosunku do osadu, który dokładnie rozprowadza się i wiruje (10 000 obr./min).





Ryc. 1. Chromatogram TLC różnicujący izomery kwasu DAP w szczepie *Propionibacterium sp.* (1); standard LL- i mezo-DAP (2). Układ rozwijający: metanol-pirydyna-10M HCl-woda (80: 10: 2,5: 17,5; v/v/v/v), wywoływacz: ninhydryna

BHI wzbogaconym 5% dodatkiem surowicy cielęcej w warunkach beztlenowych, osiągając szczyt logarytmicznej fazy wzrostu po siedmiu dobach inkubacji w temp. 37°C.

W preparatach mikroskopowych obserwowano charakterystyczne, rozgałęzione formy promieniowcopodobne (ryc. 2A). Na przynależność izolatu do rodzaju *Actinomyces* wskazywała również morfologia kolonii: drobnych, lśniących, wypukłych, z pojedynczymi, brzeźnie umiejscowionymi i wyraziście białymi ziarnami (ryc. 2B).

Wśród cech fenotypowych szczepu zwracała uwagę wyraźna reakcja wytwarzania katalazy, tym istotniejsza, że większość przedstawicieli *Actinomyces* nie ma tej właściwości, zaś *A. viscosus* należy pod tym względem do nielicznych wyjątków.

W celu identyfikacji czynnika etiologicznego, rozpoznanego wstępnie w laboratorium szpitalnym, niezbędne były badania chemiotaksonomiczne hydrolizatów i ekstraktów całych komórek, uzupełnione ukierunkowaną analizą ściany komórkowej. Wykazane w peptydoglikanie aminokwasy diaminowe, tj. lizyna i ornityna (ryc. 3), potwierdziły przynależność szczepu do rodzaju *Actinomyces* (typ V ściany komórkowej), natomiast marker cukrowy (galaktoza) pozwolił jednoznacznie określić jego gatunek jako *A. viscosus*, bowiem cukier ten w szczepach *A. naeslundii* nie występuje [32].

Warto zauważyć, że całościowy profil chemiotaksonomiczny uzupełniający ogólną charakterystykę szczepu w pełni odpowiada jego właściwej pozycji systematycznej.

Potwierdzają to: a) kwasy tłuszczowe prostolańcuchowe (głównie C16:0, C18:0, C18:1), a także brak rozgałęzionych form tych związków; b) fosfatydylocholina (PC), jako dominujący lipid polarny (ryc. 4), znamienny dla typu III fosfolipidowego (PIII) [15]; c) glikolipidy: g, obecny, ale



Ryc. 2. Szczep *Actinomyces viscosus* (izolat 2); A – 7-dobowa hodowla płynna na podłożu BHI z dodatkiem 5% surowicy cielęcej, warunki beztlenowe, barwienie metodą Grama, powiększenie 1000×. B – Kolonie na podłożu BHI, inkubacja: 9 dni, warunki beztlenowe, temp. 37°C, powiększenie 5×

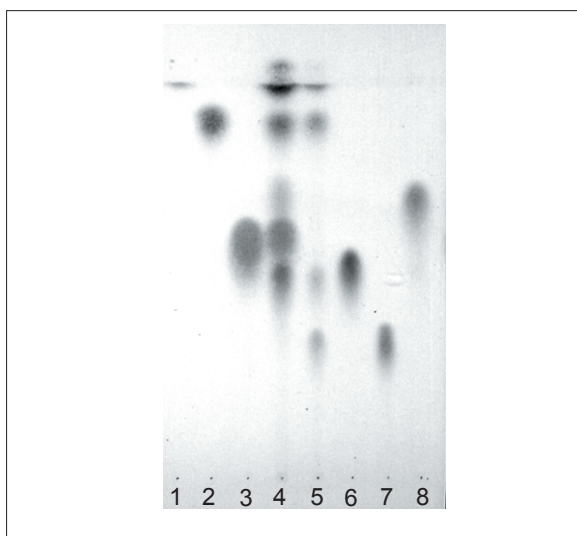
niemający znaczenia taksonomicznego [19], i (nieobecny) G, marker chemiotaksonomiczny o typie galaktozyloglicerydu, występujący jedynie (w nieznacznych ilościach) w komórkach *A. naeslundii* [14]. Uzyskane wyniki dowodzą, że badany izolat należy do gatunku *A. viscosus*.

#### *Staphylococcus hominis* i *Rothia mucilaginosa*

Bakterie wyizolowano z krwi dwuletniego dziecka z objawami zapalenia kości (nr 3) oraz z ropni promieniczopodobnych okolicy szyjno-twarzowej dorosłego pacjenta (nr 4 i 5). Identyfikacja szczepów 3 i 4 – ziarniaków Gram-dodatnich – za pomocą komercyjnego systemu API jako *Staphylococcus hominis* budziła wątpliwości.

Wśród podstawowych właściwości kształtujących ogólny profil morfologiczno-biochemiczno-chemiotaksonomiczny badanych szczepów zwracała uwagę: nieregularność skupisk komórkowych (ryc. 5), słaba reakcja wytwarzania katalazy, a w hydrolizatach całych komórek brak aminokwasów mezo- i LL-DAP oraz cukrów diagnostycznie ważnych.

Podstawowe badania okazały się jednak niewystarczające do rozstrzygnięcia zaistniałych wątpliwości i wy-



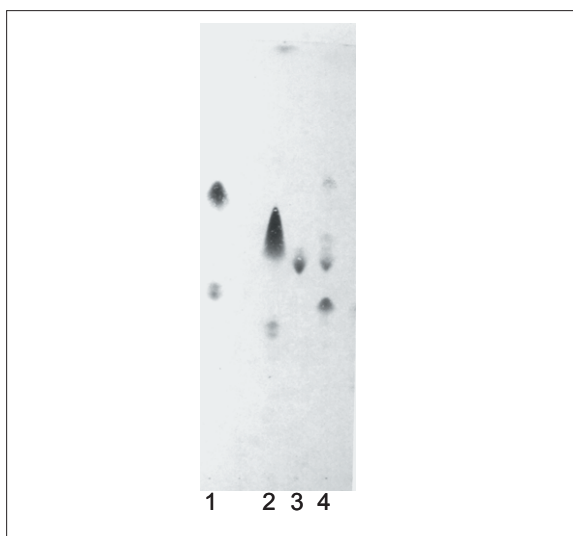
Ryc. 3. Chromatogram TLC hydrolyzatów ściany komórkowej izolatów *Actinomyces viscosus* (5) i *Staphylococcus hominis* (4). Standardy aminokwasów: alanina (1), kwas glutaminowy (2), glicyna (3), lizyna (6), ornityna (7), kwas asparaginowy (8). Układ rozwijający: metanol-pirydyna-10MHCl-woda (80:10:2,5:17,5 v/v/v/v), wywoływacz: ninhydryna

magaly pogłębienia analizy, zwłaszcza chemiotaksonomicznej, w tym peptydoglikanu ściany komórkowej z uwzględnieniem aminokwasów i cukrów diagnostycznie ważnych oraz profilu lipidowego. Badania te wykazały, że znamienymi składnikami peptydoglikanu są lizyna i glicyna (ryc. 3), a jedynym markerem cukrowym jest glukozamina. Wśród kwasów tłuszczowych przeważały formy rozgałęzione kwasów C15:0, C17:0, C19:0 (*izo, anteizo*) i prostolącuchowe C18:0, C20:0, oraz fosfolipidy typu PI, z których żaden nie wyróżniał się swoistością taksonomiczną.

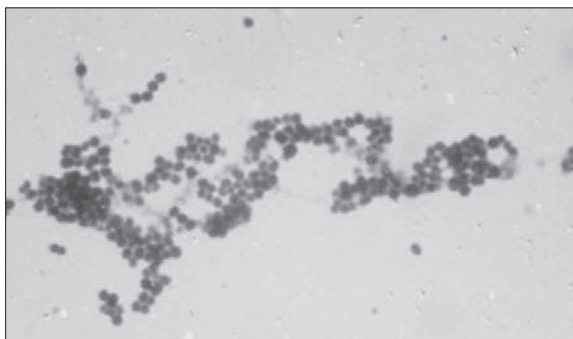
Po wykonaniu badań okazało się, że chemiotaksonomiczny profil badanych szczepów (nr 3 i 4) nie był porównywalny z żadnym innym taksonem ziarniaków Gram-dodatnich poza rodzajem *Staphylococcus*. Co więcej, znamienne dla obu izolatów cechą o charakterze markerów okazał się wykryty w ich komórkach glikolipid główny – G (ryc. 6).

Związki tego typu, wykorzystywane ostatnio w klasyfikacji aktynobakterii [23], są strukturalnie zróżnicowane, co znajduje odbicie w ich ruchliwości chromatograficznej (Rf), dlatego można je łatwo wykazać za pomocą TLC. Występujące np. w osłonach komórkowych *Micrococcus* czy *Arthrobacter* mają zwykle charakter dimannozylomonoacyloglicerydów o swoistości rodzajowej [25]; natomiast u podobnych do nich gronkowców, z którymi mogą być mylone, są to głównie diglukozylodiglicerydy [14] i w przypadkach alternatywnych, takich jak izolaty 3 i 4, można je wykorzystać jako gatunkowo znamienne.

Reasumując należy potwierdzić, że tym razem rozpoznanie badanych szczepów za pomocą zestawu diagnostycznego API jako *Staphylococcus hominis* okazało się zgodne z ich tożsamością ustaloną wg współczesnych zasad klasyfikacji bakterii i nie budzi zastrzeżeń.



Ryc. 4. Chromatogram TLC fosfolipidów szczepu *Actinomyces viscosus* (4). Standardy fosfolipidów: fosfatydyloetanolina (1), fosfatydyloglicerol (2), fosfatydylocholina (3). Układ rozwijający: chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v/v), wywoływacz: odczynnik Dittmera i Lestera

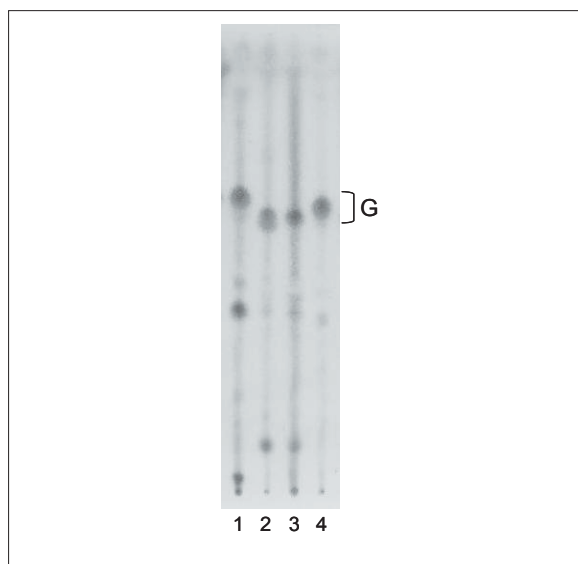


Ryc. 5. Preparat z hodowli płynnej szczepu *Staphylococcus hominis* (izolat 3). Podłoże 79, inkubacja 48 h, warunki tlenowe, barwienie metodą Grama, powiększenie 1000x

Wykazano również, że szczep nr 4 był przyczyną przewlekłej infekcji mieszanej, ze współdziałaniem nie tylko gronkowca *Staphylococcus hominis*. Po częściowym opanowaniu symptomów choroby przez zastosowanie terapii fagowej, u pacjenta pojawiły się nowe ropnie, z których wyizolowano aktynobakterie oportunistyczne (szczep nr 5), zidentyfikowane jako *Rothia mucilaginosa*. Rozpoznano składniki osłon komórkowych izolatu, tj. lizynę, alaninę i glicynę, ponadto rozgałęzione kwasy tłuszczowe oraz lipidy polarne, w tym fosfolipidy typu I, a nade wszystko glikolipid typu G o strukturze dimannozyloacylomoglicerydu [26] i swoistości taksonomicznie znamiennej głównie dla przedstawicieli rodziny *Micrococcaceae* (ryc. 6).

Należy dodać, że gatunek *Rothia mucilaginosa* należał niedawno do monotypowego rodzaju *Stomatococcus* i gatunku *S. mucilaginosa*. Jego reklasyfikacja do taksonu *Rothia* [3] rozwiązała problem monotypowego charakteru obu tych rodzajów i od tej pory liczba doniesień o izolatach klinicznych reprezentujących nowe gatunki *Rothia* wyraźnie wzrasta.





Ryc. 6. Chromatogram TLC wykazujący glikolipidy główne (G) w surowych ekstraktach lipidowych izolatów klinicznych *Staphylococcus hominis* (3) i *Rothia mucilaginosa* (4) oraz w odpowiadającym odpowiadających im ekstraktach szczepów typowych (2 i 1), użytych jako standardy. Układ rozwijający: chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v/v), wywoływacz: roztwór orcyzolu

### *Streptomyces* spp.

Pierwszy z izolatów (nr 6) wyhodowano ze skrzepliny ropnej powstałej w wyniku kolonizacji wszczepionego stymulatora serca. Pokryte białym nalotem grzybni powietrznej kolonie wrastały w podłoże (ryc. 7), w preparatach mikroskopowych obserwowano nietypowe, dichotomicznie rozgałęzione bakterie Gram-dodatnie.

Drugi izolat (nr 7) pochodził od chorego poddanego pierwotnie terapii przeciwnowotworowej, która była skuteczna i pacjent w zadowalającym stanie zdrowia został wypisany ze szpitala. Nastąpił jednak nawrót choroby i w trakcie hospitalizacji pacjenta, z popłuczyn oskrzelowych wyhodowano szczep, który przekazano nam do identyfikacji. Izolat wyróżniał się charakterystycznym zapachem ziemi oraz grzybnią podstawową wrastającą w podłoże agarowe (agar Columbia), pokrytą białym nalotem grzybni powietrznej. Właściwości morfologiczno-fizjologiczne obu izolatów, zwłaszcza wyrazistość grzybni podstawowej i powietrznej, wymagania tlenowe, rozkład skrobi i hemoliza typu  $\beta$  wskazywały, że mogą one być przedstawicielami rodzaju *Streptomyces*. Wydawało się to interesujące, ponieważ te wybitnie głębokie mikroorganizmy, znane głównie jako najbogatsze źródło naturalnych antybiotyków, wywołują tylko sporadycznie infekcje oportunistyczne – streptomycetozę.

Potwierdzeniem wstępnej diagnozy było: 1) wykazanie w komórkach tych izolatów kwasu LL-DAP, będącego głównym markerem chemiotaksonomicznym kilku zaledwie taksonów promieniowców, w tym *Streptomyces*; 2) uzupełnienie ich ogólnej charakterystyki chemiotaksonomicznej analizą komplementarnych markerów osłon komórkowych, jakimi są związki cukrowe i lipidowe. Okazało się, że szczep izolowany ze skrzepliny nie zawierał cukrów



Ryc. 7. Kolonie szczepu *Streptomyces* sp. (izolat 6). Podłoże agarowe z dodatkiem krwi baraniej, inkubacja 48 h, warunki tlenowe, temp. 37°C

diagnostycznie ważnych ani też kwasów tłuszczowych typu mikolowego, czy też 10-metylorozgałęzionych (np. tuberkulostearynowego), natomiast charakteryzowały go głównie krótsze kwasy tłuszczowe rozgałęzione, *izoC16:0*, *anteizoC15:0* i *anteizoC17:0*, tj. typ 2c [13] oraz PE – typ fosfolipidowy II [14]. Dowodzi to, że ogólny profil chemiotaksonomiczny izolatu klinicznego nr 6 należy do rodzaju *Streptomyces*. Natomiast izolat nr 7, bardzo podobny do poprzedniego pod względem właściwości fenotypowych i chemiotaksonomicznych, różnił się zawartością galaktozy (wykazanej w hydrolizatach całych komórek).

Rodzaj *Streptomyces* należy do I typu ściany komórkowej [15], charakteryzującego się obecnością LL-DAP i brakiem cukrów taksonomicznie ważnych. Ostatnio identyfikuje się nowe gatunki tego rodzaju np. *S. yunnanensis*, w których w hydrolizatach całych komórek wykrywana jest galaktoza [38]. Identyfikacja gatunkowa badanych szczepów jest skomplikowana i wymaga zastosowania technik molekularnych, opartych na analizie 16S rRNA oraz hybrydyzacji DNA-DNA.

### PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania potwierdzają trudności mikrobiologów i klinicystów w rozpoznawaniu zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez drobnoustroje należące do obszernej klasy *Actinobacteria*. Dowodzą tego zdarzające się pomyłki zarówno w identyfikacji tych drobnoustrojów, jak i w diagnozie wywoływanych przez nie chorób.

Prawidłowa identyfikacja aktywnobakterii, zwłaszcza wobec wzrastającej liczby zakażeń oportunistycznych wywoływanych przez promieniowce, wymaga zastosowania diagnostyki kompleksowej. Brak laboratoriów referencyjnych utrudnia poznanie etiologii i częstości występowania aktywnomicetoz, a niekiedy uniemożliwia skuteczną terapię ze wszystkimi tego konsekwencjami, zwłaszcza gdy infekcje dotyczą chorych z dysfunkcją układu odpornościowego.

Przedstawione przykłady kompleksowych badań aktywnobakterii ze szczególnym uwzględnieniem ich genetycznie uwarunkowanych markerów komórkowych ukazują możliwość zminimalizowania błędów diagnostycznych. W tym celu istotne jest wykorzystanie uproszczonych metod chromatograficznych oraz precyzyjnych technik molekularnych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] 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
- [2] Collins M.D.: Isoprenoid quinones. W: Chemical methods in prokaryotic systematics, red.: M. Goodfellow, A.O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester. New York 1994, 265–310
- [3] Collins M.D., Hutson R.A., Baverud V., Falsen E.: Characterization of a *Rothia*-like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosa* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000; 50: 1247–1251
- [4] Dittmer J.C., Lester R.L.: A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res., 1964; 5: 126–127
- [5] Embley T.M., Wait R.: Structural lipids of Eubacteria. W: Chemical methods in prokaryotic systematics, red.: M. Goodfellow, A. O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester, New York 1994, 121–162
- [6] Funke G., von Graevenitz A., Clarridge J.E., Bernard K.A.: Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev., 1997; 10: 125–159
- [7] Gamian A., Mordarska H., Ekiel I., Ulrich J., Szponar B., Defaye J.: Structural studies of the major glycolipid from *Saccharopolyspora* genus. Carbohydr. Res., 1996; 296: 55–67
- [8] Hancock I.C.: Analysis of cell wall constituents of Gram-positive bacteria. W: Chemical methods in prokaryotic systematics, red.: M. Goodfellow, A. O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester, New York 1994, 63–84
- [9] Hidri N., Farina C., Mordarska H., Szponar B., Paściak M., Grzegorzewicz A., Gamian A., Boiron P.: *Nocardia*, nokardioza i nokardiomikoza. Mikrobiologia Medycyna, 2000; 24/25: 10–17
- [10] Huang Y., Zhao N., He L., Wang L., Liu Z., You M., Guan F.: *Arthrobacter scleromae* sp. nov. isolated from human clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 2005; 43: 1451–1455
- [11] Jantzen E., Bryn K.: Analysis of cellular constituents from Gram-negative bacteria. W: Chemical methods in prokaryotic systematics, red.: M. Goodfellow, A. O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester, New York 1994, 39
- [12] Kędzia W.: Podłoża używane do hodowli i identyfikacji laseczek bez-tlenowych. W: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie, red.: E. Wiśniowiecka, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich Warszawa 1990, 194–197
- [13] Kroppenstedt R.M.: Fatty acid and menaquinone analysis of *Actinomycetes* and related organisms. W: Chemical methods in bacterial systematics, red.: M. Goodfellow, D.E. Minnikin. Academic Press London 1985, 173–199
- [14] Lechevalier M.P.: Lipid in bacterial taxonomy – a taxonomist's view. CRC Crit. Rev. Microbiol., 1977; 5: 109–210
- [15] Lechevalier M.P., Lechevalier H.A.: The chemotaxonomy of actinomycetes. W: Actinomycete Taxonomy, red.: A. Dietz, D.W. Thayer. Special Publication 6, Arlington, VA, Society for Industrial Microbiology, 1980, 227–291
- [16] Lechevalier M.P., Stern A.E., Lechevalier H.A.: Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. W: Actinomycetes, red.: K.P. Schaal, G. Pulverer. Zentbl. Bakteriol. Hyg. 1 Abt Suppl 11, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany 1981, 111–116
- [17] Locci R.: *Streptomyces* and related genera. W: Bergey's manual of systematic bacteriology, t.4, red.: S.T. Williams, M.E. Sharpe, J.G. Holt. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1986, 2451–2492
- [18] Mordarska H.: Promieniowce tlenowe oraz ich znaczenie w patologii ludzkiej i zwierzęcej. I. Aktywność egzogenne – charakterystyka, etiologia, epidemiologia i patogenez. Post. Hig. Med. Dośw., 1992; 46: 257–274
- [19] Mordarska H.: Taxonomic value of glycolipids of actinomycetes and allied taxa. The Actinomycetes, 1985/1986; 19: 11–32
- [20] Mordarska H., Mordarski M.: Cell lipids of Nocardia. W: The Actinomycetales, red.: H. Prauser, Gustav Fischer, Jena 1970, 47–53
- [21] Mordarska H., Mordarski M., Goodfellow M.: Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. J. Gen. Microbiol., 1972, 71: 77–86
- [22] Mordarska H., Paściak M.: A simple method for differentiation of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium propionicum*. FEMS Microbiol. Lett., 1994; 123: 325–329
- [23] Mordarska H., Szponar B., Paściak M., Gamian A.: Promieniowce chorobotwórcze i bakterie promieniowcopodobne: problemy taksonomiczne, diagnostyczne i kliniczne. Mikrobiologia Medycyna, 1999; 2: 3–10
- [24] Mordarska H., Zakrzewska-Czerwinska J., Paściak M., Szponar B., Rowinski S.: Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardiosis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1998; 21: 47–55
- [25] Paściak M., Ekiel I., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A.: Structure of the major glycolipid from *Rothia dentocariosa*. Biochim. Biophys. Acta, 2002; 1594: 199–205
- [26] Paściak M., Holst O., Lindner B., Mierzchała M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A.: Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginosa*. Biochim. Biophys. Acta, 2004; 1675: 54–61
- [27] Paściak M., Holst O., Lindner B., Mordarska H., Gamian A.: Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T). J. Biol. Chem., 2003; 278: 3948–3956
- [28] Paściak M., Mordarska H.: Rodzaj *Propionibacterium* – heterogenność taksonomiczna i biologiczna. Post. Microbiol., 1999; 38: 245–256
- [29] Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A.R.: Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by liquid chromatography. Anal. Chem., 1965; 37: 1602–1604
- [30] Schaal K.P.: Genus *Actinomyces* Harz 1877, 133AL. W: Bergey's manual of systematic bacteriology, t.2, red.: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1986, 1383–1418
- [31] Schleifer K.H.: Gram-Positive Cocci. W: Bergey's manual of systematic bacteriology, t.2, red.: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1986, 999–1103
- [32] Slack J.M., Gerencser M.A.: *Actinomyces*, filamentous bacteria – biology and pathogenicity. Burgess Publishing Company, Minneapolis 1975, 65–69
- [33] Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L.: Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 1997; 47: 479–491
- [34] Staneck J.L., Roberts G.D.: Simplified approach to the identification of aerobic *Actinomycetes* by thin-layer chromatography. Appl. Microbiol., 1974; 28: 226–231
- [35] Szponar B., Mordarska H.: Struktura i antygenowość głównego glikolipidu bakterii oportunistycznych *Rhodococcus equi*. Post. Hig. Med. Dośw., 1996; 50: 533–535
- [36] Tilton R.C., McGinnis M.R.: Pathogenic aerobic actinomycetes. W: Clinical and pathogenic microbiology, red.: B.J. Howard, J. Klaus II, S.R. Rubin, A.S. Weissfeld, R.C. Tilton, C.V. Mosby Co., St. Louis 1987, 553–558
- [37] Wieser M., Denner E.B.M., Kampfer P., Schumann P., Tindall B., Steiner U., Vybiral D., Lubitz W., Maszenan A.M., Patel B.K.C., Seviour R.J., Radax C., Busse H.J.: Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lysae* (Kloos et al. 1974). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2002; 52: 629–637
- [38] Zhang Q., Li W.J., Cui X.L., Li M.G., Jiang C.L.: *Streptomyces yunnanensis* sp. nov., a mesophile from soils in Yunnan, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2003; 53: 217–221

