

POSTĘPY W TAKSONOMII I METODACH IDENTYFIKACJI IZOLOWANYCH OD LUDZI BAKTERII Z RODZAJU *CORYNEBACTERIUM*

Anna Katarzyna Kwaszewska^{1*}, Eligia Maria Szewczyk¹

¹Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 90-235 Łódź ul. Pomorska 137, e-mail: ZMF@umed.lodz.pl

Wpłynęło w lutym 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Postępy taksonomii rodzaju *Corynebacterium*. 3. Metody wykorzystywane w identyfikacji, taksonomii i typowaniu pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*. 3.1. Metody genotypowe. 3.2. Metody fenotypowe: morfologia, chemotaksonomia, właściwości biochemiczne. 4. Konsekwencje trudności w identyfikacji pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*. 5. Nowe gatunki *Corynebacterium* izolowane od ludzi. 6. Podsumowanie

Progress in taxonomy and methods of identification of members of the *Corynebacterium* genus isolated from humans

Abstract: In recent years a significant progress in taxonomy of *Corynebacterium* genus has been recorded. In the current century over 40 new corynebacteria species have been described. In this publication, genetic and phenotypic methods used in the taxonomy, identification and typing of these bacteria were evaluated. Genetic methods to studies *Corynebacterium* include analysis of conservative genes (16 rRNA, *rpoB*, 16S-23S rRNA intergenic spacer), DNA-DNA hybridization and RAPD and MLST typing. Chemotaxonomic methods include analysis of G+C content in DNA, cell-wall chemotype or cellular fatty acid composition. Eighteen new *Corynebacterium* species isolated from human clinical specimens and their biochemical characteristics were described.

1. Introduction. 2. Progress in taxonomy of *Corynebacterium* genus. 3. Methods used in the identification, taxonomy and typing of *Corynebacterium*. 3.1. Genotypic methods. 3.2. Phenotypic methods: morphology, chemotaxonomy, biochemical properties. 4. Consequences of problems with the identification of *Corynebacterium*. 5. New species of *Corynebacterium* isolated from humans. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Corynebacterium*, metody, taksonomia

Key words: *Corynebacterium*, methods, taxonomy

1. Wprowadzenie

Ostatnie, trzecie wydanie podręcznika *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* oparto na wynikającym z teorii Woese'go filogenetycznym podejściu do taksonomii [62, 88]. System filogenetyczny, uwzględniający wspólne ewolucyjne dziedzictwo stanowi obecnie podstawę wyodrębniania nowych taksonów i często, nowego umiejscawiania już istniejących. W praktyce, budowa tworzonego drzewa rodowego bakterii wynika z sekwencji nukleotydów zawartych w małej podjednostce 16S bakteryjnego rybosomu (SSU – small subunit). W specjalnie skonstruowanych bazach Ribosomal Database Project (RDP) i SILVA deponowane są dobrze udokumentowane i sprawdzone dane dotyczące budowy odcinków RNA pochodzących od szczepów bakterii, w tym od uznanych za typowe (wzorcowe: type strains) [17, 64]. W bazie SILVA wzbogacono te dane o sekwencje dużej podjednostki 23S rRNA (LSU – large subunit). Wielokierunkowa analiza sekwencji dokonywana jest etapami przy użyciu kolejnych narzędzi z pakietu ARB [56]. Każda jednostka taksonomiczna jest też dodatkowo analizowana w kontekście 1000 sekwencji

pochodzących od drobnoustrojów należących do innych typów lub domen. Od 2000 roku do chwili obecnej ukazały się dopiero trzy z pięciu zapowiadanych tomów klucza Bergey'a, a prace nad kolejnymi postępują wolno. Nadal oczekujemy na tom, który roboczo nosi tytuł „The *Actinobacteria*”, w którym zawarta będzie systematyka i opis maczugowców. Postęp prac i opracowany dotąd kształt drzewa logenetycznego tego typu jest jednak dostępny w postaci publikowanego w internecie zarysu (outline) [57]. Nowe gatunki maczugowców są opisywane w publikacjach ukazujących się w *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Przyjęto, że jest to jedyne czasopismo, gdzie publikowane są wiarygodne dane o tym, że opisany gatunek jest nowy. Nakłada to na radę wydawniczą trudny obowiązek weryfikowania poprawności przedstawianych przez autorów argumentów w świetle najnowszych ustaleń. Publikacja taka wymaga wypełnienia odpowiedniego protokołu i zastosowania się do szeregu ściśle określonych zasad [79]. Materiały te, oraz najnowsza edycja LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) [27] stały się źródłem informacji dotyczących taksonomii przedstawianej w tym artykule.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedry Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 90-235 Łódź ul. Pomorska 137; 90-235 Łódź ul. Pomorska 137; tel./fax 42 677 93 00; e-mail: anna.kwaszewska@umed.lodz.pl

2. Postępy taksonomii rodzaju *Corynebacterium*

Rodzaj *Corynebacterium* zalicza się do rodziny *Corynebacteriaceae*, należącej do typu *Actinobacteriae* oprócz kilku innych rodzin, w tym *Mycobacteriaceae* i *Nocardiaceae*. Rodzina *Corynebacteriaceae* obejmowała niegdyś rodzaje *Corynebacterium*, *Listeria* i *Erysipelothrix* [60]. Następnie, według propozycji zarysu z 2004 roku dla nowego wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [41] mieścił się w niej jedynie rodzaj *Corynebacterium*, a obecnie według aktualizacji z grudnia 2010 roku *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [27] rodzina *Corynebacteriaceae* obejmuje cztery rodzaje: *Bacterionema*, *Caseobacter*, *Turicella* i *Corynebacterium*.

Rodzaj *Corynebacterium* utworzony został przez Lehmana i Neumanna w 1896 roku i wówczas obejmował *Corynebacterium diphtheriae*, odpowiedzialne za ciężką i często występującą wtedy chorobę błonicę oraz gatunki będące patogenami zwierzęcymi [27, 41, 57].

Początkowo znaczenie kliniczne przypisywano jedynie bezwzględnie chorobotwórczemu gatunkowi *C. diphtheriae*, który został scharakteryzowany w latach 80. XIX wieku. W tym okresie opisano również gatunek *C. pseudodiphtheriticum*, a w końcu lat 90. *C. xerosis*. W latach 70. ubiegłego stulecia coraz większe zainteresowanie zaczęły budzić gatunki wchodzące w skład fizjologicznej mikroflory człowieka, gdyż okazało się, że mogą one wywoływać zakażenia oportunistyczne.

Aktualnie, baza J.P. E u z é b y: *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* [27] obejmuje 108 gatunków *Corynebacterium*, z których 19 zostało przeklasyfikowanych do innych rodzajów. Baza *Taxonomic Outline*, opracowana przez zespół *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* z 2007 roku [42], wymienia 73 gatunki *Corynebacterium* oraz 14, głównie stanowiących patogeny roślinne, które zostały obecnie zaliczone do innych rodzajów (*Rhodococcus*, *Curtobacterium*, *Clavibacter*, *Arthrobacter*, *Rathayibacter*, *Tsukamurella*, *Arcanobacterium*). Spośród gatunków maczugowców ujętych w tej bazie, 25 zostało opisanych lub zreklasyfikowanych w latach 90. ubiegłego wieku, a 22 – w tym stuleciu. Od 2007 roku w *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* opisano kolejne 19 nowych gatunków. Ogółem, w ostatnich 20 latach, w obrębie rodzaju *Corynebacterium* umieszczono 66 nowych gatunków. W tabeli I zestawiono gatunki opisane w obecnym stuleciu.

3. Metody wykorzystywane w identyfikacji, taksonomii i typowaniu pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*

3.1. Metody genotypowe

Identyfikacja maczugowców stanowi dla bakterio-
logów klinicznych jedno z najtrudniejszych zadań. Wykorzystanie biologii molekularnej dla badania DNA tych

Gatunki *Corynebacterium* opisane po 2000 roku

Tabela I

Gatunki izolowane od ludzi	Gatunki izolowane od zwierząt	Gatunki izolowane ze środowiska
<i>C. simulans</i> , 2000 [86]	<i>C. auriscanis</i> , 2000 [21]	<i>C. casei</i> , 2001 [10]
<i>C. freneyi</i> , 2001 [66]	<i>C. capitovis</i> , 2001 [19]	<i>C. mooreparkense</i> ** ₂₀₀₁ [10]
<i>C. appendices</i> , 2002 [96]	<i>C. felinum</i> , 2001 [20]	<i>C. efficiens</i> , 2002 [32]
<i>C. aurimucosum</i> , 2002 [95]	<i>C. testudinoris</i> , 2001 [20]	<i>C. glaucum</i> , 2003 [93]
<i>C. atypicum</i> , 2003 [47]	<i>C. aquilae</i> , 2003 [29]	<i>C. halotolerans</i> , 2004 [15]
<i>C. tuberculostearicum</i> , 2004 [31]	<i>C. sphenisci</i> , 2003 [46]	<i>C. doosanense</i> , 2009 [54]
<i>C. resistens</i> , 2005 [63]	<i>C. spheniscorum</i> , 2003 [45]	<i>C. lubricantis</i> , 2009 [49]
<i>C. tuscaniense</i> , 2006 [69]	<i>C. suicordis</i> , 2003 [83]	<i>C. maris</i> , 2009 [4]
<i>C. hansenii</i> , 2007 [67]	<i>C. caspium</i> , 2004 [18]	<i>C. humireducens</i> , 2010 [89]
<i>C. ureicelerivorans</i> , 2007 [91]	<i>C. ciconiae</i> , 2004 [30]	<i>C. nuruki</i> , 2010 [72]
<i>C. sputi</i> , 2008 [94]	<i>C. ulceribovis</i> , 2009 [92]	<i>C. marinom</i> , 2010 [24]
<i>C. canis</i> , 2009 [33]	<i>C. mustelae</i> , 2010 [35]	
<i>C. freiburgense</i> , 2009 [36]		
<i>C. massiliense</i> , 2009 [59]		
<i>C. timonense</i> , 2009 [59]		
<i>C. pilbareense</i> , 2010 [2]		
<i>C. pyruviciproducens</i> , 2010 [80]		
<i>C. stationis</i> , 2010 [7]		

* synonym *C. aurimucosum* – *C. nigricans* [23]

** nazwa *C. mooreparkense* została w 2005 roku uznana za synonim *C. variable*, w związku z czym nie została ujęta w bazie z 2007 roku dla II wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [43]

bakterii okazało się nie tak pomocne jak zakładano. Analiza genetyczna podjednostki 16S rRNA lub genu ją kodującego w przypadku drobnoustrojów należących do rodzaju *Corynebacterium* nie daje wyników porównywalnych z innymi rodzajami bakterii. Wykazuje bowiem stosunkowo niski polimorfizm. W ramach 1500 nukleotydowej sekwencji wykryto fragmenty stanowiące narzędzie dla identyfikacji, jednak nie jednoznacznej dla wszystkich gatunków w jednakowym stopniu. Tang i wsp. [75] zaproponowali identyfikację wewnątrz rodzaju *Corynebacterium* i rodzajów pokrewnych na podstawie zestawu MicroSeq 500 16S (Perkin-Elmer Biosystems), który daje możliwość sekwencjonowania pierwszych 527 par zasad genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Autorzy otrzymali satysfakcjonujące wyniki w przypadku 27 spośród 42 badanych izolatów klinicznych maczugowców. Prawidłowo zidentyfikowano wszystkie izolaty *Corynebacterium jeikeium* i *C. diphtheriae*, ale dla innych gatunków tego rodzaju skuteczność metody wynosiła tylko 50%. W obrębie innych rodzajów: *Arthrobacter*, *Brevibacterium* i *Microbacterium* wyniki były bardzo dobre. Osiągnięto identyfikację do gatunku, co nie było możliwe metodami fenotypowymi. Sekwencjonowanie wskazanego przez Tang i wsp. [75] fragmentu, choć kosztowne, pozwoliło na wykonanie badania w czasie 18 godzin. Problem identyfikacji gatunków w obrębie rodzaju *Corynebacterium* okazał się jednak nadal nie rozwiązany. Podjęto zatem próby poszukiwania innych konserwatywnych sekwencji w genomie tego przedstawicieli.

W 2004 roku Khamis i wsp. [50] zaproponowali użycie, jako markera filogenetycznego i identyfikacyjnego dla *Corynebacterium*, genu *rpoB* kodującego podjednostkę beta polimerazy RNA. Analiza sekwencji genu *rpoB* była przydatna w badaniach nad innymi taksonami: *Bartonella*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Legionella* i dobrze się sprawdzała przy różnicowaniu drobnoustrojów wykazujących wysoki stopień podobieństwa genetycznego. Licząca około 3500 par zasad sekwencja *rpoB* maczugowców była silniej zróżnicowana niż sekwencja 16S rRNA, a mimo to drzewa pokrewieństwa filogenetycznego zbudowane na podstawie obu sekwencji dla dobrze scharakteryzowanych gatunków okazały niemal identyczne [51]. Pozwoliło to na wykorzystywanie analizy genu *rpoB* w identyfikacji i opisywaniu nowych gatunków *Corynebacterium*.

Poszukiwanie fragmentów sekwencji pozwalających na różnicowanie wewnątrz rodzaju *Corynebacterium* doprowadziło do odkrycia ich, podobnie jak u innych bakterii, w DNA przestrzeni międzygenowej genów kodujących podjednostki 16S i 23S rybosomów (16S-23S rRNA intergenic spacer) [66]. Obszary te badane są przy wykorzystaniu ITS-PCR (Internally Transcribed Spacer PCR) lub RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Funke i Frodl [34] analizując prze-

strzeń międzygenową 16S i 23S rRNA z zastosowaniem RFLP odróżnili szczepy należące do gatunków *C. xerosis* i *C. freneyi*, które na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA zaliczono by do jednego gatunku.

Opisywanie nowych gatunków maczugowców czy ich późniejsza identyfikacja oparte są także na bardzo czułej metodzie, jaką jest hybrydyzacja DNA-DNA. Analiza sekwencji pełnych genomów wskazuje, że określony jako minimum 70% dla szczepów jednego gatunku stopień hybrydyzacji odpowiada 95% homologii nukleotydów (ANI – Average Nucleotide Identity) ich DNA. Metoda ta jest bardziej czuła niż opisane wcześniej analizy genów o wysokiej konserwatywności. W przypadku nowo opisanego gatunku *C. hansenii* metody takie, jak analiza sekwencji 16S rRNA, *rpoB* czy badanie profilu przestrzeni międzygenowej 16S-23S rRNA nie pozwoliły na wydzielenie tego odmiennego fenotypowo gatunku od gatunków blisko spokrewnionych. Osiągnięto to dopiero stosując hybrydyzację DNA-DNA [67]. Podobnym przykładem może być również, opisany w 2010 roku gatunek *C. pilbarensis* nieodróżnialny na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA od scharakteryzowanych gatunków, a na podstawie hybrydyzacji DNA-DNA uznany za odrębny [2]. Wewnątrz rodzaju *Corynebacterium*, pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami maczugowców stopień hybrydyzacji DNA-DNA może wskazywać na ich podobieństwo. Wynik ten nie zawsze pokrywa się z badaniami konserwatywnych fragmentów genomu, np. pomiędzy *C. hansenii* a *C. xerosis*, *C. freneyi* i *C. amycolatum* wynik hybrydyzacji DNA-DNA to odpowiednio 47%, 40% i 15%. Tymczasem według analizy genu *rpoB*, *C. hansenii* najbliższym spokrewnionym jest z *C. freneyi* a nie *C. xerosis* [67]. Genom *C. resistens* z genomem najbliższym spokrewnionego gatunku *C. auriscanis* wykazuje tylko 23,1% homologii [63].

Zarówno sekwencjonowanie genów, jak i hybrydyzacja DNA to metody bardzo przydatne do charakterystyki nowych gatunków i identyfikacji w laboratoriach referencyjnych. Ciągłe jednak poszukuje się nowych markerów genetycznych, które byłyby specyficzne gatunkowo i pozwalałyby na konstrukcję sond genetycznych umożliwiających wiarygodną identyfikację gatunków *Corynebacterium* w laboratoriach mikrobiologicznych. Letek i wsp. [55] zaproponowali identyfikację *C. amycolatum* na podstawie amplifikacji genu *divIVA* odpowiedzialnego za podział komórki, z użyciem PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Metoda ta pozwala na odróżnienie tego gatunku od innych blisko spokrewnionych: *C. striatum*, *C. minutissimum* i *C. xerosis*. [55]. Metody oparte na biologii molekularnej, np. typowanie RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) okazały się w przypadku maczugowców przydatne w dochodzeniach epidemiologicznych. Brandenburg i wsp. [9] poszukiwali dowodu przenoszenia *C. striatum* między pacjentami na oddziałach intensywnej opieki medycznej.

RAPD i profil antybiotykowrażliwości pozwoliły potwierdzić, że izolaty wywołujące ciężkie zakażenia były tym samym szczepem i były identyczne z tymi izolowanymi od personelu i ze środowiska szpitalnego.

Dla typowania wewnątrzgatunkowego bakterii wykorzystuje się również MLST (Multi Locus Sequence Typing), metodę polegającą na analizie fragmentów kilku (5–7) wybranych genów ważnych dla ich metabolizmu bakterii. W typowaniu maczugowców po raz pierwszy metoda ta została wykorzystana w 2008 roku przez E g u c h i i wsp. [26] w analizie pokrewieństwa w obrębie *C. macginleyi*. Autorzy, opierając się na wynikach otrzymanych na podstawie sekwencjonowania genomów *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens* i *C. jeikeium* wybrali 7 konserwatywnych genów. Były to geny kodujące kinazę adenylową (*adk*), białko inicjujące replikację (*dnaA*), hydratazę fumaranową (*fumC*), syntazę cytrynianową typ II (*gltA*), podjednostkę beta gyrazy DNA (*gyrB*), dehydrogenazę izocytrynianową (*icd*) i syntetazę adenylobursztynianową (*purA*). Dyskryminacyjność otrzymanych wyników była porównywalna z otrzymanymi przy zastosowaniu RAPD. Dostępne handlowo zestawy do typowania *C. diphtheriae* metodą MLST oparte są na analizie: sekwencji pochodzących z genów kodujących łańcuch alfa syntazy ATP (*atpA*), podjednostkę alfa polimerazy III DNA (*dnaE*), białka opiekuńcze (*dnaK*), czynnika elongacji G (*fusA*), syntazę 2-isopropylójablczanową (*leuA*), dehydrogenazę 2-ketoglutaranową E1 i E2 (*odhA*), oraz proponowaną wcześniej przez K h a m i s i wsp. [50] podjednostkę beta polimerazy RNA (*rpoB*) [65].

Podobnie jak inne drobnoustroje, maczugowce stały się także obiektem badania pełnej sekwencji ich materiału genetycznego. Uzyskano w ten sposób dane, które w znacznym stopniu poszerzyły wiedzę na temat tych bakterii, chociaż nie rozwiązały problemów taksonomicznych [13, 77, 78]. Baza danych PubMed zawiera informacje o 13 ukończonych projektach sekwencjonowania genomu szczepów *Corynebacterium* spp. Dotyczą one głównie gatunków ważnych z punktu widzenia biotechnologicznego: *C. glutamicum* ATCC 13032 (3,3 Mpz), *C. glutamicum* R (3,35 Mpz) i *C. efficiens* YS-314 (3,22 Mpz). Zsekwencjonowano także DNA gatunków najważniejszych klinicznie: *C. diphtheriae* NCTC 13129 (2,49 Mpz), *C. jeikeium* K411 (2,51 Mpz) i *C. urealyticum* DSM7109 (2,4 Mpz), *C. aurimucosum* ATCC 700975 (2,83 Mpz), *C. kroppenstedtii* DSM 44385 (2,4 Mpz). Znane są także pełne sekwencje odwziewających gatunków *C. pseudotuberculosis* 1002 (2,3 Mpz), *C. pseudotuberculosis* C231 (2,3 Mpz), *C. pseudotuberculosis* I19 (2,3 Mpz) i *C. pseudotuberculosis* FRC41 (2,3 Mpz). Prowadzone są badania nad sekwencjonowaniem materiału genetycznego gatunków: *C. accolens*, *C. ammoniagenes*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. glucuronolyticum*, *C. lipophiloflavum*,

C. atruchotii, *C. resistens*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum*, a także *C. genitalium* i *C. pseudogenitalium* niemających statusu gatunku oraz gatunków izolowanych od zwierząt *C. variabile*, *C. bovis*.

Tworzona na markerach genetycznych taksonomia maczugowców ulega ciągłym zmianom i można spodziewać się, że zebranie pełnego zestawu sekwencji szczepów typowych (wzorcowych), na podstawie, których opisano poszczególne gatunki, stworzy szansę na konstrukcję bardziej jednoznacznych i uniwersalnych genetycznych testów identyfikacyjnych.

3.2. Metody fenotypowe: morfologia, chemotaksonomia, właściwości biochemiczne

W przypadku maczugowców, zarówno przy tworzeniu taksonomii, jak i przy ich identyfikacji, bardzo szeroko korzysta się z metod fenotypowych. W przypadku ustalania przynależności do rodzaju zwraca się uwagę na chemotyp ściany komórkowej i obecność krótkołańcuchowych kwasów mikołowych. Diagnostyka do poziomu gatunku wymaga wykonania dużej liczby reakcji biochemicznych, a także użycia dodatkowych technik chemotaksonomicznych. Jednak niekwestionowane autorytety w dziedzinie badań nad *Corynebacterium* spp., np. zespół Funkego, zwracają uwagę na ogromne znaczenie identyfikacji tych bakterii opartej na tych właśnie metodach. Istotną jest morfologia kolonii bakteryjnych (barwa, wielkość, kształt, konsystencja, zapach, otoczenie wokół kolonii), a także morfologia komórek. Barwienie metodą Grama pozwala, między innymi, na odróżnienie ich od szybkoorosnących bakterii kwasoopornych [37]. Oprócz typowych dla maczugowców układów popodziałowych, komórki niektórych gatunków mogą mieć kształt „bicza”, np. *C. matruchotii*, lub wykazywać charakterystyczny układ popodziałowy komórek, jak koła ze szprychami (spoke-wheel), np. *C. freiburgense* [36]. Odpowiednie barwienie, np. metodą Neissera, pozwala na wykrycie obecnych w komórkach, typowych dla tego rodzaju ziarnistości metachromatycznych. W opisie nowych gatunków, a także w identyfikacji *Corynebacterium* spp. brane są pod uwagę liczne cechy. Sprawdza się wymagania atmosferyczne hodowli, typ metabolizmu (tlenowy czy fermentacja), a także wiele cech biochemicznych, które przedstawiono w tabeli II. W identyfikacji niektórych gatunków istotny jest również wynik testu synergistycznej hemolizy – CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen).

Gotowe zestawy do identyfikacji, np. Api Coryne, API ZYM, Biotype 100 (test asymilacji źródeł węgla) (bioMérieux) czy RapID CB Plus System (Remel Inc.) pozwalają na skrócenie czasu oczekiwania na wynik. Ich bazy danych nie są jednak wystarczająco szybko uaktualniane i nie uwzględniają zmian w taksonomii, w tym danych nowo opisanych gatunków.

Cechy metaboliczne brane pod uwagę w identyfikacji i opisie nowych gatunków *Corynebacterium* spp. [31, 37, 63, 86, 91]

ZAPOTRZEBOWANIE NA: lipidy
PODSTAWOWA AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA: katalaza, oksydaza, ureaza, nitroreduktaza,
AKTYWNOŚĆ SACHAROLITYCZNA – wytwarzanie kwasu z: glukozy, rybozy, ksylozy, arabinozy, glicerolu, glikogenu, inuliny, laktozy, maltozy, mannitolu, sorbitolu, sacharozy, trehalozy, i rafinozy wytwarzanie acetoiny
HYDROLIZA: Tween 80, hipuranu, eskuliny i żelatyny,
AKTYWNOŚĆ INNYCH ENZYMÓW: fosfataza alkaliczna i kwaśna, arylamidaza leucyny, waliny, cystyny, leucyny i pirolidonylu, pirazynamidaza, dihydrolaza argininy, esterazy C4 i C8, glukozydaza, galaktozydaza, N-acetylo-b-glukozaminidaza, mannozydaza, α-fukozydaza.

W latach 2001–2003 Bohner i wsp. [8] opracowali metodę polegającą na wszechstronnej analizie fenotypu badanego drobnoustroju, którą nazwali Phenotype Micro Arrays (PM) (Biolog Inc.). Ten zautomatyzowany system pozwala na wykrycie 1920 cech fenotypowych. Są to: zdolność wykorzystywania 190 źródeł węgla, 380 źródeł azotu i 95 źródeł fosforu i siarki. Próby obejmują również badanie metabolicznych szlaków biosyntezy, wpływ pH, ciśnienia osmotycznego i różnych jonów na metabolizm komórki (każde badanie w około 100 testach) oraz ocenę wrażliwości na 240 związków chemicznych (każdy w czterech stężeniach). Ocena metabolizmu komórki opiera się na pomiarze jej aktywności oddechowej w określonych warunkach wyrażonej zdolnością redukcji barwnika tetrazoliowego. Według autorów przy zastosowaniu systemu PM możliwa jest identyfikacja bakterii oraz drożdży i grzybów nitkowatych. System ten uwzględnia również identyfikację bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. Baza danych obejmuje 57 gatunków *Corynebacterium* – głównie patogenów ludzi i zwierząt, wśród których 9 opisanych w obecnym stuleciu. Autorzy proponują ułatwione podejście do opisu nowych gatunków: od fenotypu do genotypu. Wstępem do odkrycia nowego gatunku jest izolacja szczepu różnego od znanych w systemie PM. Rodzaje różnic fenotypowych wskazują miejsce poszukiwań różnic w genomie. Kolejnym etapem są badania chemotaksonomiczne i analiza porównawcza materiału genetycznego, która może potwierdzić pojawienie się nowego gatunku. Analiza aktywności życiowej komórek w zróżnicowanych warunkach stanowić może zatem istotne narzędzie w identyfikacji drobnoustrojów, czy w dochodzeniach epidemiologicznych, ale również w pracach nad opisywaniem nowych gatunków. Być może, ten nowy szybko rozwijający się automatyczny system stanowi szansę na poprawę możliwości identyfikacji maczugowców.

Badania chemotaksonomiczne odgrywają ważną rolę w identyfikacji maczugowców. Wśród nich najważniejsze to: profil komórkowych kwasów tłuszczowych, ultrastruktura i chemiczny skład ściany komórkowej. Jeden z podstawowych elementów przy opisie nowych gatunków wszystkich bakterii, jakim jest udział procentowy zasad G+C mol% w DNA, w przypadku maczugowców

nie daje możliwości przestrzegania kryteriów przyjętych dla innych rodzajów. U bakterii należących do jednego rodzaju, G+C mol% powinien różnić się nie więcej niż o 10%, a u szczepów należących do jednego gatunku – o 3%. Rodzaj *Corynebacterium* ma wysoką zawartość G+C, mieszczącą się w szerszych granicach od 51 do prawie 66 mol%. U gatunków *C. afermentans* i *C. auris* wartość ta jest wyższa niż 65 mol% [50], a u nowo opisanego – *C. appendicis* wynosi 65,8 mol% [96]. Dlatego kryterium to nie jest wartościową cechą przy ustalaniu przynależności do rodzaju. W zaklasyfikowaniu nowego izolatu do rodzaju *Corynebacterium* istotne znaczenie ma skład ściany komórkowej. Rodzaj ten ma bowiem specyficzną budowę tej struktury. Zawiera ona cukry – arabinozę i galaktozę (arabinogalaktan), kwas mezo-diaminopimelinowy (meso-DAP), unikatowe niskocząsteczkowe alfa-alkilo-beta-hydroksy-długołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwasy korynemikolowe oraz dwuwodorowe menachinony z 8 lub 9 jednostkami izoprenu: MK-8 (H2), MK-9 (H2) a także fostatydyloinozytol [22, 37, 60]. Wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) kwasów mikolowych w ścianie komórkowej ma istotne znaczenie w odróżnianiu *Corynebacterium* spp. od innych rodzajów (*Corynebacterium* – C₂₂-C₃₈, *Rhodococcus* – C₃₄-C₆₄, *Nocardia* – C₄₄-C₆₀, *Mycobacterium* – C₆₀-C₉₀) [11]. Przy zastosowaniu tej metody wśród przedstawicieli rodzaju są jednak także odstępstwa, które należy brać pod uwagę. Niektóre gatunki maczugowców nie zawierają w ścianie kwasów korynemikolowych. Są to: *C. kroppenstedtii*, *C. amycolatum* czy *C. atypicum* [47]. Przy analizie obecności charakterystycznych dla rodzaju cukrów ściany komórkowej: arabinozy i galaktozy opisano gatunki zawierające tych cukrów znacznie mniej niż to przyjęto dla całego rodzaju, np. *C. simulans* [86]. W przypadku szczepów lipofilnych składniki podłoża, konieczne wobec braku u nich syntazy kwasów tłuszczowych, mogą wpływać na obecność i budowę kwasów korynemikolowych [77].

Maczugowce od innych spokrewnionych rodzajów bakterii można odróżnić w oparciu o analizę komórkowych kwasów tłuszczowych (CFA – Cellular Fatty Acid) za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej [5].

Komórkowe kwasy tłuszczowe w przypadku większości gatunków maczugowców są nasycone lub jednonienasycone i nierozgałęzione. Pozwala to odróżnić je od rodzajów zawierających rozgałęzione kwasy tłuszczowe takich jak *Brevibacterium*, *Rothia* czy *Listeria*. Także i tu są wyjątki. Dotyczą one *C. bovis* i *C. urealyticum* [90]. Metoda ta jest stosowana głównie w laboratoriach referencyjnych i stanowi narzędzie pomocnicze [5]. Zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach gatunków *Corynebacterium* spp. zależy od warunków hodowli (np. dodatek związków tłuszczowych niezbędnych do wzrostu gatunków lipofilnych), a wiele z nich ma podobny profil tych kwasów. Metoda ta jest mało przydatna w odróżnianiu gatunków [74]. Van der Velde i wsp. [84] twierdzą jednak, że mała użyteczność analizy komórkowych kwasów tłuszczowych w różnicowaniu gatunkowym w obrębie rodzaju *Corynebacterium* wynika z nieaktualnych baz danych. Autorzy zaproponowali własną bazę danych, na podstawie której udało się im przypisać do gatunku 29 spośród 34 badanych izolatów. Niektóre gatunki jak *C. pseudotuberculosis* cechuje heterogenność profilu komórkowych kwasów tłuszczowych. Cechą charakterystyczną niektórych gatunków jest występowanie kwasu tuberkulostearynowego. Początkowo jego obecność przypisywana była jedynie szczepom należącym do „*C. tuberculostearicum*”. Z czasem jednak opisano zdolność wytwarzania tego kwasu przez inne gatunki, jak *C. urealyticum*, *C. mucifaciens*, *C. minutissimum*, *C. singulare*, *C. confusum*, a także przez niedawno opisane *C. aurimucosum*, *C. appendicis*, *C. ureicelerivans*, co pozwala odróżnić je od pozostałych [84, 91, 96].

Niektóre gatunki rodzaju *Corynebacterium* można zidentyfikować określając skład fosfolipidów metodą chromatografii cienkowarstwowej [61] lub stosując zaawansowane techniki analizy chemotaksonomicznej jak na przykład FAB-MS (Fast-Atom Bombardment) i ESI-MS (Electrospray Ionization). Zastosowanie FAB-MS pozwala na odróżnienie gatunków na podstawie acylowanych podstawników dołączonych do kwasów tłuszczowych [90]. Precyzyjną metodą jest badanie składu chemicznego całej komórki poddanej pirolizie metodami spektrometrii i chromatografii. Voisin i wsp. [85] zaproponowali opartą na pirolizie chromatografię gazową (Pyrolysis-Gas Chromatography), a następnie za pomocą emisji atomowej (Atomic Emission Detection – AED) dokonali identyfikacji *C. amycolatum* i spokrewnionych gatunków: *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis* i *C. freneyi*. Metody te nie są wprawdzie stosowane rutynowo w diagnostyce, ale stanowią precyzyjne narzędzie poznawcze.

W przypadku maczugowców podobieństwo fenotypowe często nie daje się potwierdzić podobieństwem genotypowym, a czasem i odwrotnie. Riegel i wsp. [70] porównując i grupując szczepy kliniczne maczugowców tworzyli „genomogatunki”. Cechy fenotypowe

(biotypy) szczepów wchodzących w ich skład, często nie potwierdzały wyników tych grupowań. Badacze ci nawet wśród wzorcowych szczepów zaklasyfikowanych na podstawie właściwości fenotypowych do gatunku *C. jeikeium* notowali takie zróżnicowanie genetyczne, które mogłoby tę przynależność poddawać w wątpliwość [68]. W obrębie rodzaju *Corynebacterium* występują jeszcze z pewnością nowe gatunki, albo podgatunki, które wraz z postępem wiedzy znajdą swoje właściwe miejsce w taksonomii. Wyzwaniem są tu, między innymi, szczepy klasyfikowane obecnie do tzw. „grup CDC”. W 1981 roku w Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób w Atlancie (Center for Disease Control and Prevention USA) zajęto się opisywaniem i systematyzowaniem szczepów bakterii o cechach nieformalnej grupy „coryneform” (Maczugowate). Grupa ta obejmuje szereg rodzajów bakterii o podobnej morfologii mikroskopowej i niektórych cechach fizjologicznych. Zaliczano do niej różne rodzaje, oprócz *Corynebacterium* również *Brevibacterium*, *Turicella*, *Rothia* i kilka innych rodzajów [37]. Obecnie odchodzi się już od wyróżniania tej grupy. Jednak zgromadzona w laboratorium w Atlancie kolekcja szczepów typowych dla poszczególnych grup CDC oznaczanych literami i czasem cyframi (np. CDC Coryneform group?), nadal jest w użyciu. Wiele szczepów tej kolekcji stało się podstawą opisu nowych gatunków, czasem odległych rodzajów, np. wśród maczugowców *Corynebacterium* grupa CDC JK to obecnie *C. jeikeium*. Wiele szczepów określanых jako „grupa CDC” mimo scharakteryzowania nie może jeszcze uzyskać statusu gatunku, a czasem nawet przypisania do określonego rodzaju. Pomocne z pewnością okażą się najnowsze bazy danych i narzędzia do ich porządkowania (np. SILVA i ARB) po wprowadzeniu do nich sekwencji ich genomów.

4. Konsekwencje trudności w identyfikacji pałeczek z rodzaju *Corynebacterium*

Problemy w identyfikacji maczugowców nakazują z ostrożnością podchodzić do cech klinicznych i zdolności wywoływania określonych zakażeń przypisywanych poszczególnym ich gatunkom, szczególnie jeśli ich opis i charakterystyka kliniczna pojawiły się dawno. Przykładem może być *C. xerosis*, jeden z najwcześniej, bo w 1899 roku, opisanych gatunków [27]. Przypisywano mu udział w obejmujących wiele narządów zakażeniach u chorych z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego [53]. Tymczasem Funke i wsp. [37, 38] twierdzą, że zakażenia tym gatunkiem są niezwykle rzadkie, a szczepy *C. xerosis* były i są mylone podczas identyfikacji biochemicznej z blisko spokrewnionymi *C. amycolatum* i *C. striatum*. Wraz z rozwojem metod stosowanych w dochodzeniach taksonomicznych opisano liczne nowe gatunki, które będąc spokrewnione z gatunkami

opisanymi wcześniej, mogły być przyczyną błędnych wniosków dotyczących ich chorobotwórczości. Tym samym obecnie trudno z całą stanowczością twierdzić, że niektóre gatunki są bardziej chorobotwórcze niż inne. Dysponujemy bowiem ograniczonymi lub niepewnymi danymi z laboratoriów prowadzących diagnostykę mikrobiologiczną.

5. Nowe gatunki *Corynebacterium* izolowane od ludzi

W rozdziale tym zamieszczono opis nowo opisanych gatunków, które izolowano z materiału od ludzi i scharakteryzowano w ostatnich 10 latach, a które mogą okazać się ważne ze względów klinicznych. W wielu przypadkach opublikowany opis nie dostarcza wystarczają

cych danych, które pozwalałyby na ich fenotypową identyfikację. Wszystkie wymienione tu gatunki uwzględnione są w spisie gatunków według E u z é b y' e g o [27], ale jeszcze nie wszystkie znalazły się w szkicu – filogenetycznym drzewie skonstruowanym dla potrzeb piątego tomu II wydania *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [42, 57]. Właściwości biochemiczne tych szczepów przedstawiono w tabeli III.

W 2001 roku opisano nowy gatunek spokrewniony z *C. xerosis* i *C. amycolatum* – *C. freneyi*. Szczepy dla niego typowe wyizolowano z trzech próbek materiału klinicznego: ropy pobranej z palca stopy, z owrzodzenia żyłaka i z przetoki podskórnego ropnia [66]. Początkowo, te nielipofilne maczugowce, na podstawie cech biochemicznych, zostały zidentyfikowane jako *C. xerosis*. Jednak badania oparte na porównaniu

Tabela III

Podstawowe właściwości gatunków maczugowców opisanych w ciągu ostatnich dziesięciu lat [2, 7, 14, 31, 33, 36, 47, 59, 63, 66, 67, 69, 80, 86, 91, 94–96]

Cecha	<i>C. simulans</i>	<i>C. freneyi</i>	<i>C. appendicis</i>	<i>C. aurimucosum</i>	<i>C. atypicum</i>	<i>C. tuberculostearicum</i>	<i>C. resistens</i>	<i>C. tuscaniense</i>	<i>C. hansenii</i>	<i>C. ureidelerivorans</i>	<i>C. sputi</i>	<i>C. canis</i>	<i>C. freiburgense</i>	<i>C. massiliense</i>	<i>C. timonense</i>	<i>C. pilbarensis</i>	<i>C. pyruviciproducens</i>	<i>C. stationis*</i>
Liczba szczepów typowych w CCUG	3	10	1	6	1	25	1	1	1	6	1	1	1	4	2	1	7	1
Lipofilność	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	bd	-	-	bd	bd	-	bd	-
Redukcja azotanów	+	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Pirazynoamidaza	V	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Arylamidaza pirolidonylu	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Fosfataza alkaliczna	+	+	+	-	-	V	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	V	V
Beta-glukuronidaza	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Beta-galaktozydaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Alfa-glukozydaza	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetylo-beta-glukozaminidaza	-	-	-	-	-	v/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydroliza eskuliny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	V	-
Ureaza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Hydroliza żelatyny	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja glukozy	+	+	(+)	+	+	+	-	+	+	V	V	+	+	-	-	+	V	V
Fermentacja rybozy	V	+	-	-	+	+	-	-	+	W	-	-	+	-	-	-	V	V
Fermentacja ksylozy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja mannitolu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentacja maltozy	-	+	(+)	+	+	V	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Fermentacja laktozy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fermentacja sacharozy	+	+	-	+	+	V	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	V	-
Fermentacja glikogenu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ – reakcja dodatnia; (+) reakcja dodatnia po 7 dniach inkubacji; w – słaba reakcja dodatnia; v – wynik reakcji zmienny;

- – wynik reakcji ujemny; bd – autorom nie udało się uzyskać danych w dostępnych źródłach

* – opisane jeszcze jako *Brevibacterium stations* – przeklasyfikowane do *Corynebacterium* spp. w 2010 roku

CCUG – kolekcja Culture Collection, University of Göteborg, Sweden [14]

przestrzeni międzygenowej 16S-23S, sekwencjonowaniu rRNA (rDNA) oraz hybrydyzacji DNA-DNA pozwoliły na zaliczenie wyizolowanych szczepów do innego, nowego gatunku. Samo badanie homologii 16S rRNA nie pozwoliło na odróżnienie *C. freneyi* od *C. xerosis*, a umożliwiło to dopiero badanie homologii sekwencji genu *rpoB*. *C. reneyi* jest blisko spokrewniony z *C. xerosis*, a w dalszej kolejności z *C. amycolatum*. Gatunki te są często mylone wtedy, gdy identyfikacja oparta jest tylko na cechach biochemicznych [37, 38]. Drobnoustroj izolowano później z licznych materiałów klinicznych. Au z i a s i wsp. [3] wyhodowano go z krwi pacjenta poddanego zabiegowi chirurgii naczyniowej. Opisany szczep był wrażliwy na amoksycylinę. W 2008 roku Fu n k e i wsp. [34] scharakteryzowali 18 nowych, izolowanych od ludzi szczepów należących do *C. freneyi*. Wyodrębniono je z ropy, owrzodzenia żyłaków, z pochwy, szyjki macicy, jądra, ucha zewnętrznego, biopsji dwunastnicy oraz moczu. Szczepy te były wrażliwe na antybiotyki beta-laktamowe, często jednak odporne na erytromycynę. A a l b æ k i wsp. [1] wyizolowali również patogenne szczepy *C. freneyi* od zwierząt – z zakażeń ucha zewnętrznego u psów.

Gatunkiem blisko spokrewnionym z *C. xerosis*, a także *C. freneyi* jest *C. hansenii*. Został on opisany w 2007 roku przez Re n a u d a i wsp. [67]. Sekwencje 16S rRNA, a także *rpoB* oraz profil przestrzeni międzygenowej 16S-23S nie odróżniają go od tych dwóch gatunków. O jego wyodrębnieniu zadecydowały wyniki hybrydyzacji DNA-DNA. Szczep, który stał się wzorcem tego gatunku wyizolowano z tłuszczako-mięsaka. Wykazywał wrażliwość na większość antybiotyków w tym beta-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, glikopeptydy. Był odporny na fosfomycynę, pefloksacynę i tetracyklinę.

Kolejny blisko spokrewniony z *C. freneyi*, *C. hansenii*, *C. xerosis*, *C. amycolatum* i odzwierzęcym *C. sphenisci* gatunek został opisany w roku 2008 przez Ya s s i n i Si e r i n g [94]. Został nazwany *C. sputi*, ponieważ był wyizolowany po raz pierwszy z płwociny chorego z zapaleniem płuc. Szczep różni się biochemicznie od innych gatunków i tworzy osobną linię w klastrze obejmującym wymienione gatunki pokrewne.

W 2002 roku Ya s s i n i i wsp. [95] opisali nowy gatunek *C. aurimucosum* (syn. *C. nigricans*) charakteryzując dwa takie same genetycznie szczepy, z których jeden pochodził z krwi pacjenta z zapaleniem oskrzeli. Określono, że filogenetycznie gatunek ten najbliższy jest spokrewniony z *C. minutissimum*. Historia wyodrębnienia tego gatunku wskazuje, jak bardzo skomplikowany bywa proces ustalania taksonomii maczugowców i jak duże znaczenie mają badania porównawcze za pośrednictwem baz sekwencji DNA. W tym samym bowiem czasie, w 2001 i 2003 roku, Sh u k l a i wsp. [73, 74] na podstawie cech 6 nielipofilnych szczepów *Corynebacterium* spp. wytwarzających czarny barwnik, opi-

sali nowy gatunek – *C. nigricans*. Szczepy pochodziły z układu moczowo-płciowego kobiet, u których wystąpiły poważne komplikacje w ciąży. Analiza 16S rRNA i porównanie z bazą danych GenBank wykazały podobieństwo opisanego przez nich gatunku ze szczepami opisanymi już w 1999 roku przez innych badaczy [76]. Jeden z tych szczepów również wytwarzał czarny barwnik i został wprowadzony do kolekcji CDC i zaliczony do grupy CDC 4. Równolegle, w 2002 roku B e r n a r d i i wsp. [6] w pracy charakteryzującej 73 szczepy *Corynebacterium* spp. izolowane z materiału klinicznego poza Europą, opisali dwa szczepy nazwane przez nich *Corynebacterium-like*, podobne do opisanych w 2001 roku przez Sh u k l ę i wsp. [74]. Wyodrębniono je z narządów płciowych – z owrzodzenia sromu oraz materiału z pochwy [6]. Szczepy te różniły się pod względem cech biochemicznych. W latach 1969–2004 laboratorium referencyjne CDC zgromadziło 63 szczepy, które wytwarzały nierozpuszczalny w wodzie, czarny barwnik. Izolowane były one głównie z materiału pochodzącego z żeńskich dróg moczowo-płciowych (82%), ale również z sutka, gardła, płwociny, oskrzeli oraz krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego noworodków. Wszystkie te szczepy zostały zaliczone do grupy CDC 4 – fermentujących pałeczek Maczugowatych (grupa CDC FCG4) [23]. Dopiero badania oparte na hybrydyzacji DNA-DNA pozwoliły na zaliczenie części szczepów do wariantu wytwarzającego czarny barwnik – *Rothia dentocariosa*, a pozostałe, na podstawie sekwencjonowania 16S rRNA, do wariantu wytwarzającego czarny barwnik – *C. aurimucosum*. Okazało się więc, że *C. aurimucosum* i *C. nigricans* to jeden gatunek, dla którego pozostawiono wcześniej nadaną nazwę *C. aurimucosum*. Badania oparte na sekwencjonowaniu genu *rpoB* potwierdziły, że *C. aurimucosum* i *C. nigricans* są tym samym gatunkiem a ich nazwy synonimami [50, 51]. Opisano również szczepy *C. aurimucosum* niewytwarzające czarnego barwnika. Gatunek jest zatem niejednorodny pod tym względem. Nie wytwarzające barwnika szczepy izolowane były z ostrych i przewlekłych zakażeń kości i stawów [71], ze stopy cukrzycowej [44]. Stwierdzono również obecność tych drobnoustrojów w środowisku [25]. W 2010 roku Tr o s t i i wsp. [81] zsekwencjonowali genom szczepu *C. aurimucosum* izolowanego z wymazu z pochwy kobiety, u której nastąpiło poronienie. Badania te pozwoliły na scharakteryzowanie tego gatunku jako patogenu oportunistycznego o szczególnym powinowactwie do dróg rodnych. Wykazano, że za zdolność kolonizacji i zakażenia środowiska pochwy odpowiedzialne są fimbrie adhezyjne podobne strukturalnie do fimbrii SpaH u *C. diphtheriae*. Wykryto również gen *aap* kodujący białko, które może mieć znaczenie dla zdolności tworzenia biofilmów przez te bakterie (Bap), a także unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Okazało się także, że istotną rolę

w kolonizacji środowiska pochwy odgrywa wydzielany przez te bakterie charakterystyczny, nierozpuszczalny w wodzie czarny barwnik. Jego synteza kodowana jest na plazmidzie pET44827. Związek ten ułatwia kolonizację i chroni komórki przed niekorzystnym działaniem nadtlenu wodoru wytwarzanego przez bakterie kwasu mlekowego bytujące w pochwie jako mikroflora fizjologiczna [81]. Źródłem zakażenia jest prawdopodobnie przewód pokarmowy lub skóra [40, 58].

Większość nowych gatunków maczugowców to gatunki nielipofilne. Jednak według ogólnie przyjętej opinii, szczególna zdolność kumulowania genów oporności na antybiotyki dotyczy przede wszystkim maczugowców lipofilnych. Szczególnie często izolowane są *C. jeikeium* i *C. urealyticum*, które stanowią zagrożenie jako potencjalne patogeny alarmowe w szpitalach. W 2005 roku O t s u k a i wsp. [63] opisali nowy gatunek lipofilny *C. resistens*. Pięć izolatów, które były podstawą opisu gatunku wyizolowano z materiału klinicznego od ludzi: z krwi, aspiratu oskrzelowego oraz ropni od chorych z nowotworami. Okazały się one odporne na większość grup antybiotyków w tym beta-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, chinolony i tetracykliny, a wrażliwe jedynie na glikopeptydy. Badania porównawcze oparte na sekwencjonowaniu 16S rRNA i hybrydizacji DNA-DNA wskazały, że nowy gatunek jest najbliższym spokrewnionym z *C. auriscanis* i *C. falsenii*. Jednak te są gatunkami nie wymagającymi do wzrostu substancji tłuszczowych i na ogół nie charakteryzowały się opornością na leki przeciwbakteryjne. W dalszej kolejności nowy gatunek wykazywał wysokie pokrewieństwo z lipofilnymi *C. jeikeium* i *C. urealyticum*.

W przypadku niektórych nowo opisanych gatunków maczugowców badanie ograniczone tylko do sekwencji 16S rRNA okazało się dobrym, wystarczającym narzędziem identyfikacyjnym. Wśród nich znalazł się nielipofilny gatunek *C. simulans*, scharakteryzowany w 2000 roku [86]. Jego opis, oparto na cechach trzech szczepów, które izolowano z ropnia stopy, z bioptatu węzła chłonного pachowego i czyraka. Ich kolonie przypominały *C. minutissimum* i *C. striatum*. Drobnoustroje te były odporne na antybiotyki. Badania chemotaksonomiczne wykazały skład ściany komórkowej typowy dla innych gatunków *Corynebacterium* spp., przy czym ilość galaktozy była mniejsza niż u innych wcześniej opisanych gatunków. Analiza 16S rRNA odróżniła izolowane szczepy od podobnych fenotypowo, co dało podstawę do opisu nowego gatunku. W 2002 roku B e r n a r d i i wsp. [6] opisali kolejne dwa szczepy *C. simulans*, pochodzące z żółci i z krwi. Okazało się, iż drugi ze szczepów opisanych przez B e r n a r d a i i wsp. nie wytwarzał katalazy. Nie spowodowało to jednak jego reklasyfikacji. Obecności tego gatunku została stwierdzona wśród mikroflory towarzyszącej zmianom zapalnym przyzębia [39]. Kolejny gatunek wyróżniony na podstawie sekwencji

16S rRNA – *C. appendicis* [96] to lipofilny, wytwarzający ureazę maczugowiec pochodzący z jamy otrzewnej pacjenta z ropnym zapaleniem wyrostka robaczkowego. W 2003 roku H a l l i i wsp. [47] opisali *C. atypicum*. Opis oparli na cechach 5 nielipofilnych szczepów izolowanych z rany, nasienia, ropy i owrzodzenia żylaka. Przeprowadzane przy identyfikacji maczugowców badania chemotaksonomiczne nie wykazały obecności w ich komórkach typowych dla rodzaju *Corynebacterium* kwasów korynemikolowych. Analiza 16S rRNA wykazała jednak, że bakterie te należą do rodzaju *Corynebacterium*. Mimo znacznych różnic fenotypowych, opisany gatunek spokrewniony jest z *C. kroppenstedtii*, również nie zawierającym kwasów korynemikolowych.

Złożona historia opisu nowego gatunku *C. tuberculostearicum* rozpoczęła się 20 lat przed jego ogłoszeniem. W 2004 roku F e u r e r i i wsp. [31] opublikowali informacje o nowym gatunku opisanym na podstawie cech 9 szczepów, które pochodziły z różnego materiału klinicznego i żywności. Były one podobne do szczepów referencyjnych nie posiadających statusu gatunku „*C. tuberculostearicum*” i „*C. pseudogenitalium*”. Pierwszy został scharakteryzowany w 1984 roku przez B r o w n a i i wsp. [12] jako wymagający lipidów maczugowiec pochodzący ze zmian leprotycznych (LDC – Leprosy-Derived Corynebacteria). Zawierał on kwas tuberkulostearynowy (10-metylooktadekanowy). Nie traktowano go jako prawdziwego gatunku, więc nazwę opatrzone cudzysłowem. Nie był on również uwzględniany w *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* do 2004 roku. Analiza porównawcza sekwencji 16S rRNA wykazała, że wszystkie izolaty, także „*C. pseudogenitalium*”, są ze sobą blisko spokrewnione i autorzy zaproponowali, aby nadać im rangę nowego gatunku *C. tuberculostearicum*. Gatunek ten jest lipofilny, najbliższym spokrewnionym z innymi lipofilnymi gatunkami *C. accolens* i *C. macginleyi*. Analiza oparta na sekwencji genu *rpoB* [51] wskazuje na najbliższe podobieństwo nowo opisanego gatunku *C. tuberculostearicum* do *Corynebacterium* grupa CDC G.

Kolejny nowy gatunek lipofilny – *C. ureicelerivorans* został opisany w 2007 roku [91]. Szczep tego gatunku został wyizolowany z krwi pacjenta z objawami sepsy. Analiza genu 16S rRNA pozwoliła określić najbliższe pokrewieństwo z *C. mucifaciens*, a w dalszej kolejności z obu podgatunkami *C. afermentans*.

Nowy nielipofilny gatunek – *C. tuscaniense* został scharakteryzowany w 2006 roku przez R i e g e l a i i wsp. [28, 69]. Jego szczep wzorcowy, początkowo opisany jako *C. tuscaniae* został wyosobniony z krwi chorego na zapalenie wsierdza. Pod względem właściwości biochemicznych gatunek wykazywał podobieństwo do *C. amycolatum*, jednak analiza chemotaksonomiczna wykazała obecność kwasów tłuszczowych, których *C. amycolatum* w ścianie komórkowej nie zawiera. Analiza genu kodującego podjednostkę 16S rRNA pozwoliła

na stworzenie nowej gałęzi w drzewie rodzaju *Corynebacterium*. Nowo opisany gatunek wykazuje największe podobieństwo do *C. appendicis*, a także *C. mucifaciens*, *C. rieglia* i *C. coyleae*.

W 2009 roku wyodrębniono i zaakceptowano, opisanym w *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* cztery nowe gatunki, które pochodziły z materiału od ludzi. Były to *C. canis*, *C. freiburgense*, *C. massliense* i *C. timonense*. *C. canis* oraz *C. freiburgense* zostały opisane przez *Funkę* i *wsp.* [33, 36]. Oba izolaty, które stały się szczepami wzorcowymi dla tych gatunków pochodziły z ran po pogryzieniu przez psa. Analiza sekwencji genu 16S rRNA oraz fragmentu genu *rpoB* wskazała na duże pokrewieństwo filogenetyczne tych dwóch gatunków. Oba gatunki są nielipofilne i fenotypowo różnią się od innych gatunków *Corynebacterium* spp. *C. canis* ma nitkowate komórki o długości większej 15 µm, mogące się rozgałęziać na końcach. Na podłożu stałym tworzy wypukłe kolonie silnie związane z podłożem. Kolonie *C. freiburgense* również bardzo silnie przylegają do podłoża, a obraz mikroskopowy ze starszych hodowli przypomina koła ze sprychami.

Merhej i *wsp.* [59] podczas badania dwóch, różniących się od dotychczas poznanych szczepów maczugowców, opisali kolejne gatunki: *C. massliense* i *C. timonense*. Zostały one scharakteryzowane na bazie taksonomii polifazowej uwzględniającej morfologię mikro- i makroskopową, cechy biochemiczne, budowę ściany komórkowej, analizę sekwencji genu 16S rRNA oraz genu *rpoB*. Szczep wyizolowany z krwi pacjenta z zapaleniem wsierdza stał się wzorcem gatunku *C. timonense*. Gatunek ten okazał się najbliższym spokrewnionym z *C. auris*, *C. capitovis*, *C. lipophiloflavum* i *C. mycetoides*. Drugi szczep, izolowany z płynu stawu biodrowego pobranego od chorego z infekcją protezy ortopedycznej opisano jako *C. massliense*. Genetycznie gatunek ten okazał się najbliższym spokrewnionym z *C. maginleyi*, *C. accolens*, *C. tuberculostearicum*, a w dalszej kolejności z *C. confusum*, *C. mastitidis* i *C. renale*.

Rok 2010 przyniósł opisy trzech nowych gatunków wyizolowanych od ludzi: *C. pilbarensis*, *C. stationis* i *C. pyruviciproducens*. *C. pilbarensis* został opisany przez *Aravena-Román* i *wsp.* [2] na podstawie cech jednego szczepu pochodzącego z aspiratu z kostki. Drobnoustrój ten został wyhodowany na podłożu dla bakterii beztlenowych, ale analiza chemotaksonomiczna wykazała obecność krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych typowych dla rodzaju *Corynebacterium*. Homologia sekwencji genu 16S rRNA (99%) wskazywała na bardzo bliskie pokrewieństwo z opisanym *C. ureiceleivorans*, ale drobnoustroje te znacznie różniły się pod względem właściwości metabolicznych. Hybrydyzacja DNA-DNA pozwoliła na wykazanie istotnych różnic genetycznych (tylko 39,5% pokrewieństwo), co przesądziło o wydzieleniu nowego gatunku. Z kolei gatunek

C. stationis został zaproponowany przez *Bernard* i *wsp.* [7]. Opis został stworzony na bazie dwóch szczepów izolowanych z kału niemowlęcia oraz reklasyfikacji dwóch szczepów należących do *Brevibacterium stationis* i *C. ammoniagenes*. Jest to pierwszy gatunek w obrębie rodzaju *Corynebacterium*, który ma zdolność rozkładu cytrynianu i alkalizowania podłoża.

C. pyruviciproducens opisali *Tong* i *wsp.* [80]. Szczep, który stał się wzorcem dla tego gatunku został wyizolowany z ropnia pachwiny. Analiza sekwencji 16S rRNA oraz części sekwencji genu *rpoB* wskazała na najbliższe pokrewieństwo z *C. glucuronolyticum*. Metodą hybrydyzacji DNA-DNA wykazano jednak niskie pokrewieństwo genetyczne z tym gatunkiem. Nowy gatunek różnił się także szeregiem cech fenotypowych, w tym zdolnością tworzenia kwasu pirogronowego, która to cecha dała podstawę nadania mu nazwy.

6. Podsumowanie

Wydzielanie nowych taksonów maczugowców oparte jest, w największym stopniu na wykazywaniu różnic w sekwencjach genomu. Podejście filogenetyczne ma niezaprzeczalne uzasadnienie. Porządkuje dotychczasowe wyniki i wyklucza niepotrzebne powtórzenia, gdyż niektóre gatunki, jak się okazało, były opisane pod różnymi nazwami, należącymi czasem do odległych taksonów. Klasyfikacja genetyczna okazuje się jednak nie w pełni doskonała. Ciągłe prowadzone są dyskusje na temat definicji gatunku. W kontekście taksonomii maczugowców są one szczególnie ważne. Sugeruje się bowiem, że podstawowe kryterium zaproponowane przez *Wayne* i *wsp.* [87] czyli tożsamość 70% sekwencji mierzonej hybrydyzacją DNA-DNA, jest zbyt mała, aby szczepy zaliczone do tego samego gatunku przedstawiały możliwe do przewidzenia podobieństwo cech fenotypowych. Posługując się przykładem *Escherichia coli* autorzy pokazują, że oznaczać to może różnice w budowie aż 1000 genów funkcjonalnych, co pociąga poważne konsekwencje w ekologii szczepów, a odrębność ekologiczna jest jednym z elementów definicji gatunku [16, 52]. Znaczne genetyczne podobieństwo może dotyczyć drobnoustrójów wyraźnie odmiennych fenotypowo, szczególnie pod względem chorobotwórczości, np. *E. coli* i *Shigella* spp. [48]. Dlatego z nadzieją należy spojrzeć na nowe techniki oceny fenotypowej, jak te zaproponowane przez *Bochner* i *wsp.* [8]. Już w 1996 roku *Vandamme* i *wsp.* [82] głosili teorię taksonomii polifazowej, która szczególnie w przypadku maczugowców okazała się przydatna. Sekwencje przyjęte w tworzeniu drzewa filogenetycznego tych bakterii okazały się zbyt podobne i trzeba było sięgnąć po inne sekwencje genów konserwatywnych, a także po metody chemotaksonomiczne i biochemiczne. System fenetyczny

wykorzystywany jest w identyfikacyjnych systemach numerycznych, gdzie współczynniki podobieństwa wyliczane są na podstawie wielu cech. Mimo znacznego postępu identyfikacja maczugowców nadal stanowi ogromne wyzwanie, z którym wobec narastającego znaczenia klinicznego tych bakterii musimy się zmierzyć.

Piśmiennictwo

- Aalbæk B, Bemis D.A., Schjærff M., Kania S.A., Frank L.A., Guardabassi L.: Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. *Vet. Microbiol.* **145**, 292–298 (2010)
- Aravena-Roman M., Spröer C., Sträubler B., Inglis T., Yassin A.F.: *Corynebacterium pilbarensis* sp. nov., a non-lipophilic corynebacterium isolated from a human ankle aspirate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1484–1487 (2010)
- Auzias A., Bollet C., Ayari R., Drancourt M., Raoult D.: *Corynebacterium freneyi* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2777–2778 (2003)
- Ben-Dov E., Ben Yosef D.Z., Pavlov V., Kushmaro A.: *Corynebacterium maris* sp. nov., a marine bacterium isolated from the mucus of the coral *Fungia granulosa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2458–2463 (2009)
- Bernard K.A., Bellefeuille M., Ewan E.P.: Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 83–89 (1991)
- Bernard K.A., Munro C., Wiebe D., Ongsansom E.: Characteristic of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4375–4381 (2002)
- Bernard K.A., Wiebe D., Burdz T., Reimer A., Ng B., Singh C., Schindle S., Pacheco A.L.: Assignment of *Brevibacterium stationis* ZoBell and Upham 1944 Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 874–879 (2010)
- Bochner B.R.: Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 191–205 (2009)
- Brandenburg A.H., van Belkum A., van Pelt C., Bruining H.A., Mouton J.W., Verbrugh H.A.: Patient-to-patient spread of a single strain of *Corynebacterium striatum* causing infections in a surgical intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2089–2094 (1996)
- Brennan N.M., Brown R., Goodfellow M., Ward A.C., Beresford T.P., Simpson P.J., Fox P.F., Cogan T.M.: *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 843–852 (2001)
- de Briel D., Couderc F., Riegel P., Jehl F., Minck R.: High-performance liquid chromatography of corynomycolic acids as a tool in identification of *Corynebacterium* species and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1407–1417 (1992)
- Brown S., Lanéelle M.A., Asselineau J., Barksdale L.: Description of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov., a leprosy-derived *Corynebacterium*. *Ann. Microbiol.* **135**, 251–267 (1984)
- Brune I., Brinkrolf K., Kalinowski J., Pühler A., Tauch A.: The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *BMC Genomics*, **6**, 86–95 (2005)
- CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Sweden, <http://www.ccug.se/> (7 stycznia 2011 roku)
- Chen H.H., Li W.J., Tang S.K., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Xu L.H., Jiang C.L.: *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 779–782 (2004)
- Cohan F.M.: What are Bacterial species? *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 457–87 (2002)
- Cole J.R., Tiedje J.M. i wsp.: The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–D145 (2009) (praca jest dziełem 11 autorów)
- Collins M.D., Hoyles L., Foster G., Falsen E.: *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal *Phoca caspica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 925–928 (2004)
- Collins M.D., Hoyles L., Foster G., Sjöden B., Falsen E.: *Corynebacterium capitovis* sp. nov., from a sheep. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 857–860 (2001)
- Collins M.D., Hoyles L., Hutson R.A., Foster G., Falsen E.: *Corynebacterium testudinoris* sp. nov., from a tortoise, and *Corynebacterium felinum* sp. nov., from a Scottish wild cat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1349–1352 (2001)
- Collins M.D., Hoyles L., Lawson P.A., Falsen E., Robson R.L., Foster G.: Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3443–3447 (1999)
- Coyle M.B., Lipsky B.A.: Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 227–246 (1990)
- Daneshvar M.I., Brown J.M. i wsp.: Identification of some charcoal-black-pigmented CDC fermentative coryneform group 4 isolates as *Rothia dentocariosa* and some as *Corynebacterium aurimucosum*: proposal of *Rothia dentocariosa* emend. Georg and Brown 1967, *Corynebacterium aurimucosum* emend. Yassin et al. 2002, and *Corynebacterium nigricans* Shukla et al. 2003 pro synonym. *Corynebacterium aurimucosum*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4189–4198 (2004) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Du Z.J., Jordan E.M., Rooney A.P., Chen G.J., Austin B.: *Corynebacterium marinum* sp. nov. isolated from coastal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1944–1947 (2010)
- La Duc M.T., Dekas A., Osman S., Moissl C., Newcombe D., Venkateswaran K.: Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2600–2611 (2007)
- Eguchi H., Kuwahara T., Miyamoto T., Nakayama-Imahiji H., Ichimura M., Hayashi T., Shiota H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 527–532 (2008)
- Euzéby J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) <http://www.bacterio.cict.fr/> (7 stycznia 2011 roku)
- Euzéby J.P.: List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published Validation List no. 111. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2025–2027 (2006)
- Fernández-Garayzábal J.F., Egido R., Vela A.I., Briones V., Collins M.D., Mateos A., Hutson R.A., Domínguez L., Goyache J.: Isolation of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from eagles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1135–1138 (2003)
- Fernández-Garayzábal J.F., Vela A.I., Egido R., Hutson R.A., Lanzarot M.P., Fernández-García M., Collins M.D.: *Corynebacterium ciconiae* sp. nov., isolated from the trachea of black storks *Ciconia nigra*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2191–2195 (2004)

31. Feurer C., Clermont D., Bimet F., Candréa A., Jackson M., Glaser P., Bizet C., Dauga C.: Taxonomic characterization of nine strains isolated from clinical and environmental specimens, and proposal of *Corynebacterium tuberculostearicum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1055–1061 (2004)
32. Fudou R., Jojima Y., Seto A., Yamada K., Kimura E., Nakamatsu T., Hiraishi A., Yamanaka S.: *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1127–1131 (2002)
33. Funke G., Englert R., Frodl R., Bernard K.A., Stenger S.: *Corynebacterium canis* sp. nov., isolated from a wound infection caused by a dog bite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2544–2547 (2010)
34. Funke G., Frodl R.: Comprehensive Study of *Corynebacterium freneyi* strains and extended and emended description of *Corynebacterium freneyi* Renaud, Aubel, Riegel, Meugnier, and Bollet 2001. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 638–643 (2008)
35. Funke G., Frodl R., Bernard K.A.: *Corynebacterium mustelae* sp. nov., isolated from a ferret with lethal sepsis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 871–873 (2010)
36. Funke G., Frodl R., Bernard K.A., Englert R.: *Corynebacterium freiburgense* sp. nov., isolated from a wound obtained from a dog bite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2054–2057 (2009)
37. Funke G., von Graevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 125–159 (1997)
38. Funke G., Lawson P.A., Bernard K.A., Collins M.: Most *Corynebacterium xerosis* strains identified in the routine clinical laboratory correspond to *Corynebacterium amycolatum*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1124–1128 (1996)
39. Fujii R., Saito Y., Tokura Y., Nakagawa K.-I., Okuda K., Ishihara K.: Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 502–505 (2009)
40. Gao Z., Tseng C., Pei Z., Blaser M.J.: Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2927–2932 (2007)
41. Garrity G.M., Bell J.A., Liburn T.G.: Taxonomic outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2004, http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf (7 stycznia 2011 roku)
42. Garrity G.M., Liburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J., Tindall B.J.: Taxonomic outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007, <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/viewFile/181/214> (7 stycznia 2011 roku)
43. Gelsomino R., Vancanneyt M., Snauwaert C., Vandemeulebroeck K., Hoste B., Cogan T.M., Swings J.: *Corynebacterium mooreparkense*, a later heterotypic synonym of *Corynebacterium variabile*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1129–1131 (2005)
44. Goldstein E.J., Citron D.M., Merriam C.V., Warren Y.A., Tyrrell K.L., Fernandez H.T.: *In vitro* activities of doripenem and six comparator drugs against 423 aerobic and anaerobic bacterial isolates from infected diabetic foot wounds. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **52**, 761–766 (2008)
45. Goyache J., Vela A.I., Collins M.D., Ballesteros C., Briones V., Moreno J., Yorio P., Domínguez L., Hutson R., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 43–46 (2003)
46. Goyache J., Ballesteros C., Vela A.I., Collins M.D., Briones V., Hutson R.A., Potti J., García-Borboroglu P., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium sphenisci* sp. nov., isolated from wild penguins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1009–1012 (2003)
47. Hall V., Collins M.D., Hutson R.A., Lawson P.A., Falsen E., Duerden B.I.: *Corynebacterium atypicum* sp. nov., from a human clinical source, does not contain corynomycolic acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1065–1068 (2003)
48. Johnson J.R.: *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J. Med. Microbiol.* **49**, 583–585 (2000)
49. Kämpfer P., Lidders N., Warfolomeow I., Falsen E., Busse H.J.: *Corynebacterium lubricantis* sp. nov., isolated from a coolant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1112–1115 (2009)
50. Khamis A., Raoult D., La Scola B.: *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3925–3931 (2004)
51. Khamis A., Raoult D., La Scola B.: Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1934–1936 (2005)
52. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M.: The bacterial species definition in the genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**, 1929–1940 (2006)
53. Krish G., Beaver W., Sarubbi F., Verghese A.: *Corynebacterium xerosis* as a cause of vertebral osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2869–2870 (1989)
54. Lee H.J., Cho S.L., Jung M.Y., Van Nguyen T.H., Jung Y.C., Park H.K., Le V.P., Kim W.: *Corynebacterium doosanense* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2734–2737 (2009)
55. Letek M., Ordóñez E., Fernández-Natal I., Gil J.A., Mateos L.M.: Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential *divIVA* gene as a target. *FEMS Microbiol. Lett.* **265**, 256–263 (2006)
56. Ludwig W., Schleifer K.-H. i wsp.: ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1363–1371 (2004) (praca jest dziełem 32 autorów)
57. Ludwig W., Euzéby J., Whitman W.B.: Phylogenetic trees of the phylum *Actinobacteria*, http://www.bergeys.org/outlines/volume_5_actinobacteria.pdf (7 stycznia 2011 roku)
58. Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Kitoh K., Hattori M., Hayashi T., Takami H.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* **22**, 214–222 (2007)
59. Merhej V., Falsen E., Raoult D., Roux V.: *Corynebacterium timonense* sp. nov. and *Corynebacterium massiliense* sp. nov., isolated from human blood and human articular hip fluid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1953–1959 (2009)
60. Mikucka A.: Coryneform bakterie – znane drobnoustroje, nieznanne patogeny? *Post. Mikrobiol.* **42**, 385–401 (2003)
61. Niepel T., Meyer H., Wray V., Wolf-Rainer A.: Intraspecific variation of unusual phospholipids from *Corynebacterium* spp. containing a novel fatty acid. *J. Bacteriol.* **180**, 4650–4657 (1998)
62. Olsen G.J., Woese C.R., Overbeek R.: The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**, 1–6 (1994)
63. Otsuka Y., Kawamura Y., Koyama T., Iihara H., Ohkusu K., Ezaki T.: *Corynebacterium resistens* sp. nov., a new multidrug-resistant coryneform bacterium isolated from human infections. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3713–3717 (2005)
64. Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O.: SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7188–7196 (2007)
65. PubMLST, <http://pubmlst.org/cdiphtheriae/> (7 stycznia 2011 roku)

66. Renaud F.N.R., Aubel D., Riegel P., Meugnier H., Bollet C.: *Corynebacterium freneyi* sp. nov., α -glucosidase-positive strains related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1723–1728 (2001)
67. Renaud F.N.R., Le Coustumier A., Wilhem N., Aubel D., Riegel P., Bollet C., Freney J.: *Corynebacterium hansenii* sp. nov., an α -glucosidase-negative bacterium related to *Corynebacterium xerosis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1113–1116 (2007)
68. Riegel P., de Briel D., Prévost G., Jehl F., Monteil H.: Genomic diversity among *Corynebacterium jeikeium* strains and comparison with biochemical characteristic and antimicrobial susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1860–1865 (1994)
69. Riegel P., Creti R., Mattei R., Nieri A., von Hunolstein C.: Isolation of *Corynebacterium tuscaniae* sp. nov. from blood cultures of a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 307–312 (2006)
70. Riegel P., Ruimy R., de Briel D., Prévost G., Jehl F., Christen R., Monteil H.: Genomic diversity and phylogenetic relationships among lipid-requiring diphtheroids from humans and characterization of *Corynebacterium macginleyi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 128–133 (1995)
71. Roux V., Drancourt M., Stein A., Riegel P., Raoult D., La Scola B.: *Corynebacterium* species isolated from bone and joint infections identified by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 2231–2233 (2004)
72. Shin N.R., Jung M.J., Kim M.S., Roh S.W., Nam Y.D., Bae J.W.: *Corynebacterium nuruki* sp. nov., isolated from alcohol fermentation starter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2010) – praca w druku
73. Shukla S.K., Bernard K.A., Harney M., Frank D.N., Reed K.D.: *Corynebacterium nigricans* sp. nov.: proposed name for a black-pigmented *Corynebacterium* species recovered from the human female urogenital tract. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4353–4358 (2003)
74. Shukla S.K., Vevea D.N., Frank D.N., Pace N.R., Reed K.D.: Isolation and characterization of a black-pigmented *Corynebacterium* sp. from a woman with spontaneous abortion. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1109–1113 (2001)
75. Tang Y.-W., von Graevenitz A., Waddington M.G., Hopkins M.K., Smith D.H., Li H., Kolbert Ch.P., Montgomery S.O., Persing D.H.: Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1676–1678 (2000)
76. Tanner M.A., Shoskes D., Shahed A., Pace N.R.: Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and “nonbacterial” prostatitis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1863–1870 (1999)
77. Tauch A., Pühler A. i wsp.: Complete genome sequence and analysis of the multiresistant nosocomial pathogen *Corynebacterium jeikeium* K411, a lipid-requiring bacterium of the human skin flora. *J. Bacteriol.* **187**, 4671–4682 (2005) (praca jest dziełem 16 autorów)
78. Tauch A., Pühler A. i wsp.: The lifestyle of *Corynebacterium urealyticum* derived from its complete genome sequence established by pyrosequencing. *J. Biotechnol.* **136**, 11–21 (2008) (praca jest dziełem 19 autorów)
79. Tindall B.J., Kämpfer P., Euzéby J.P., Oren A.: Valid publication of names of prokaryotes according to the rules of nomenclature: past history and current practice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2715–2720 (2006)
80. Tong J., Liu C., Summanen P.H., Xu H., Finegold S.M.: *Corynebacterium pyruviciproducens* sp. nov., a pyruvic acid producer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1135–1140 (2010)
81. Trost E., Tauch A. i wsp.: Complete genome sequence and lifestyle of black-pigmented *Corynebacterium aurimucosum* ATCC 700975 (formerly *C. nigricans* CN-1) isolated from a vaginal swab of a woman with spontaneous abortion. *BMC Genomics*, **11**, 91–106 (2010) (praca jest dziełem 16 autorów)
82. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438 (1996)
83. Vela A.I., Mateos A., Collins M.D., Briones V., Hutson R.A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F.: *Corynebacterium suicordis* sp. nov., from pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2027–2031 (2003)
84. Van den Velde S., Lagrou K., Desmet K., Wauters G., Verhaegen J.: Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**, 99–104 (2006)
85. Voisin S., Deruaz D., Freney J., Renaud F.N.R.: Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. striatum* and related species by pyrolysis-gas-liquid chromatography with atomic emission detection. *Res. Microbiol.* **153**, 307–311 (2002)
86. Wattiau P., Janssens M., Wauters G.: *Corynebacterium simulans* sp. nov., a non-lipophilic, fermentative *Corynebacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 347–353 (2000)
87. Wayne L.G., Trüper H.G. i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463–464 (1987) (praca jest dziełem 12 autorów)
88. Woese C.R.: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271 (1987)
89. Wu C.Y., Zhuang L., Zhou S.G., Li F.B., He J.: *Corynebacterium humireducens* sp. nov., an alkaliphilic humic-reducing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2010) – praca w druku
90. Yagüe G., Segovia M., Valero-Guillén P.L.: Phospholipid composition of several clinically relevant *Corynebacterium* species as determined by mass spectrometry: an unusual fatty acyl moiety is present in inositol-containing phospholipids of *Corynebacterium urealyticum*. *Microbiol.* **149**, 1675–1685 (2003)
91. Yassin A.F.: *Corynebacterium ureicelerivorans* sp. nov., a lipophilic bacterium isolated from blood culture. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1200–1203 (2007)
92. Yassin A.F.: *Corynebacterium ulceribovis* sp. nov., isolated from the skin of the udder of a cow with a profound ulceration. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 34–37 (2009)
93. Yassin A.F., Kroppenstedt R.M., Ludwig W.: *Corynebacterium glaucum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 705–709 (2003)
94. Yassin A.F., Siering C.: *Corynebacterium sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pneumonia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2876–2879 (2008)
95. Yassin A.F., Steiner U., Ludwig W.: *Corynebacterium aurimucosum* sp. nov. and emended description of *Corynebacterium minutissimum* Collins and Jones (1983). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1001–1005 (2002)
96. Yassin A.F., Steiner U., Ludwig W.: *Corynebacterium appendicis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1165–1169 (2002)