

**Aleksandra Safianowska¹, Renata Walkiewicz¹,
Hanna Grubek-Jaworska¹, Zofia Zwolska²,
Ewa Augustynowicz-Kopeć², Jarosław Glapiński³, Ryszarda Chazan¹**

¹Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Pneumonologii i Alergologii A.M.
w Warszawie, kierownik: prof. dr hab. R. Chazan

²Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie,
kierownik: prof. dr hab. Z. Zwolska

³Instytut Biocybernetyki Inżynierii Biomedycznej PAN,
kierownik: prof. dr hab. Marek Darowski

ANALIZA KWASÓW MIKOLOWYCH RÓŻNYCH GATUNKÓW Z RODZAJU *MYCOBACTERIUM* METODĄ WYSOKOCIŚNIENIOWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC)

ANALYSIS OF MYCOLIC ACIDS FROM VARIOUS SPECIES *MYCOBACTERIUM* BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC).

Summary: HPLC is the most useful method to speciate mycobacteria by analysis of mycolic acids. The purpose was to prepare a library containing chromatographic patterns of mycolic acids derived from reference species *Mycobacterium*, which had been cultivated in standard conditions. 28 reference strains (27 ones from American Type Culture Collection and one cultivated from the vaccine *M. bovis* BCG) were used. The analysis of mycolic acids involved chromatographic separation of their bromophenacyl derivatives according to Centers for Disease Control recommendation. Mycolic acids profiles formed by HPLC were reproducible for all reference species in this study. Standard deviation of relative retention time of every peak did not exceed 2.5%. The species included into *M. tuberculosis* complex beyond *M. bovis* BCG shared the same mycolic acids pattern. HPLC is the only mean to distinguish *M. tuberculosis* from *M. bovis* BCG. The other studied strains had species specific patterns which differed from *M. tuberculosis* complex and *M. bovis* BCG. The prepared library comprising 28 reference elution profiles of mycolic acids from known mycobacteria species can be applied in diagnostic procedure of tuberculosis and mycobacteriosis.

Key words: mycobacteria, tuberculosis, mycolic acids, HPLC

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2002, 70, 3-4, 130-138

Wstęp Powszechnie znana cecha kwasooporności prątków jest uwarunkowana dużą zawartością lipidów, głównie glikolipidów, w ścianie komórkowej. Tylko w niewielkim stopniu są to wolne kwasy tłuszczowe. W skład glikolipidów ściany komórkowej *Mycobacterium* wchodzi długiłańcuchowe, rozgałęzione β -hydroksy-kwasy tłuszczowe z podstawnikiem alkanowym w pozycji α , zwane kwasami mikolowymi. Ich skład w ścianie komórkowej prątków jest charakterystyczny gatunkowo i na tyle stały, że może być wykorzystany jako podstawa chromatograficznych metod typowania prątków (5).

Najdogodniejszą metodą analizy składu kwasów mikolowych jest cieczerw chromatografia wysokociśnieniowa (high pressure liquid chromatography – HPLC). Metoda ta polega na porównaniu chromatogramu kwasów mikolowych

ze szczepu dzikiego z wcześniej sporządzonymi, specyficznymi gatunkowo wzorami elucyjnymi kwasów mikołowych szczepów referencyjnych. Warunkiem takiego postępowania jest ściśle zachowanie standardów procedury analitycznej i hodowli. Laboratorium Bakteriologiczne Centers for Disease Control (CDC), Atlanta, USA zaleca sporządzenie własnej biblioteki wzorów elucyjnych dla każdego rodzaju stosowanego podłoża hodowlanego (3).

Celem pracy było stworzenie biblioteki wzorów elucyjnych referencyjnych szczepów z rodzaju *Mycobacterium* hodowanych na różnych podłożach dla dalszego wprowadzenia metody HPLC typowania prątków do rutynowej diagnostyki gruźlicy i mikobakterioz. W szczególności położono nacisk na różnicowanie *M. tuberculosis* complex i najczęściej izolowanych w populacji polskiej prątków niegruźliczych (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis* – MOTT) – chorobotwórczych dla człowieka: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* i *M. kansasii* oraz niechorobotwórczych: *M. gordonae* (6).

Materiał i metody

Szczepy prątków. Bibliotekę chromatogramów sporządzono dla 27 szczepów referencyjnych rodzaju *Mycobacterium* z American Type Culture Collection (ATCC) oraz szczepu *M. bovis* BCG otrzymanego ze szczepionki przeciwgruźliczej BCG 10 BIOMED, Lublin (Tab. 1). Każdy szczep hodowano w standardowych warunkach, dwukrotnie na podłożu stałym Loewensteina-Jensena (L-J) oraz trzykrotnie na podłożu płynnym Middlebrooka 7H9. Do analizy wystarczy materiał z hodowli kolonii o średnicy 2-3 mm lub ekwiwalent masy bakteryjnej z hodowli płynnej.

Przygotowanie materiału i rozdział chromatograficzny. Zmydlanie, ekstrakcję kwasów mikołowych i estryfikację do bromofenacylowych pochodnych przeprowadzano zgodnie z metodą opisaną przez Butlera i Kilburna (1). Stosowano HPLC Beckman System Gold (Beckman Instruments, Inc., USA) zaopatrzone w pompy gradientowe model 110B, podajnik Altex model 210A z pętlą 5 μ l, termostat model 235A i detektor promieniowania UV model 166. Do od powietrzania eluentów używano Waters In-line Degasser. System był kontrolowany przez IBM PC z oprogramowaniem Beckman System Gold. Rozdziału dokonywano na kolumnie Symmetry C₁₈ 3,5 mm, 4,6 x 75 mm (Waters USA). Warunki rozdziału chromatograficznego kwasów mikołowych były zgodne z procedurą zalecaną przez CDC (3). Używano dwóch standardów wewnętrznych: nisko- i wysokocząsteczkowych bromofenacylowych pochodnych kwasów mikołowych (odpowiednio: low molecular weight – LMW, high molecular weight – HMW) Ribi ImmunoChem Research, Inc. USA. Pozostałe odczynniki pochodziły z firmy Sigma, USA. Każdy rozdział kwasów mikołowych dla szczepów referencyjnych wykonywano trzykrotnie, otrzymując dla każdego szczepu z podłoża stałego 6 chromatogramów i z podłoża płynnego 9 chromatogramów.

Standaryzacja i analiza wyników. W celu sprawdzenia powtarzalności metody obliczono średnie czasy retencji (retention time – RT) i ich procentowe odchylenia standardowe dla LMW i HMW losowo wybranych dwustu rozdziałów chromatograficznych. Wynosiły one odpowiednio: 3,45 min. \pm 1,5% oraz 9,54 min. \pm 1%. W analizie chromatogramów ocenie podlegała liczba pików i ich względny czas retencji (relative retention time – RRT) oraz względne wysokości pików (relative peak high – RPH). RRT obliczano jako stosunek RT danego pików do RT standardu wewnętrznego HMW. RPH obliczano jako stosunek wysokości danego pików do wysokości najwyższego z pików w danym wzorze elucyjnym, którego RPH przyjęto za jedność.

Tabela I. Szczepy referencyjne *Mycobacterium* wchodzące w skład biblioteki wzorów elucyjnych kwasów mikołowych uzyskanych w cieczonej chromatografii wysokociśnieniowej.
 Table I. Reference strains of mycobacteria used to construct the library acids elution profiles derived from high pressure liquid chromatography.

Lp. Number	Gatunki Species	Szczepy Strains ATCC
1.	<i>M. abscessus</i>	19 977
2.	<i>M. asiaticum</i>	25 276
3.	<i>M. avium</i>	25 591
4.	<i>M. bovis</i>	19 210
5.	<i>M. bovis-BCG</i>	szczepionka/ vaccine
6.	<i>M. celatum</i>	51 131
7.	<i>M. chelonae</i>	14 472
8.	<i>M. fallax</i>	35 219
9.	<i>M. flavescens</i>	14 474
10.	<i>M. fortuitum</i>	6 841
11.	<i>M. gordonae</i>	35 758
12.	<i>M. haemophilum</i>	29 548
13.	<i>M. hiberniae</i>	49 874
14.	<i>M. interjectum</i>	51 457
15.	<i>M. intracellulare</i>	13 950
16.	<i>M. kansasii</i>	12 478
17.	<i>M. malmoense</i>	29 571
18.	<i>M. marinum</i>	927
19.	<i>M. microti</i>	19 422
20.	<i>M. neoaurum</i>	25 795
21.	<i>M. nonchromogenicum</i>	19 530
22.	<i>M. shimoidai</i>	27 962
23.	<i>M. simiae</i>	25 215
24.	<i>M. tokaiense</i>	27 282
25.	<i>M. triviale</i>	23 292
26.	<i>M. tuberculosis</i>	27 294
27.	<i>M. vaccae</i>	15 483
28.	<i>M. xenopi</i>	19 250

ATCC – American Type Culture Collection.

**Wyniki
i omówienie**

Czas retencji kwasów mikołowych pochodzących z prątków *Mycobacterium* był zawarty pomiędzy RT standardów wewnętrznych LMW i HMW. Obliczono średnie RRT i odchylenia standardowe poszczególnych pików najbardziej interesujących nas szczepów. Dla *M. tuberculosis* procentowe odchylenie standardowe nie przekraczało 0,2% na podłożu stałym (n=6) i 0,7% na podłożu płynnym (n=9). Dla innych szczepów (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. gordonae* i *M. bovis* BCG) – nie przekraczało 2,5%.

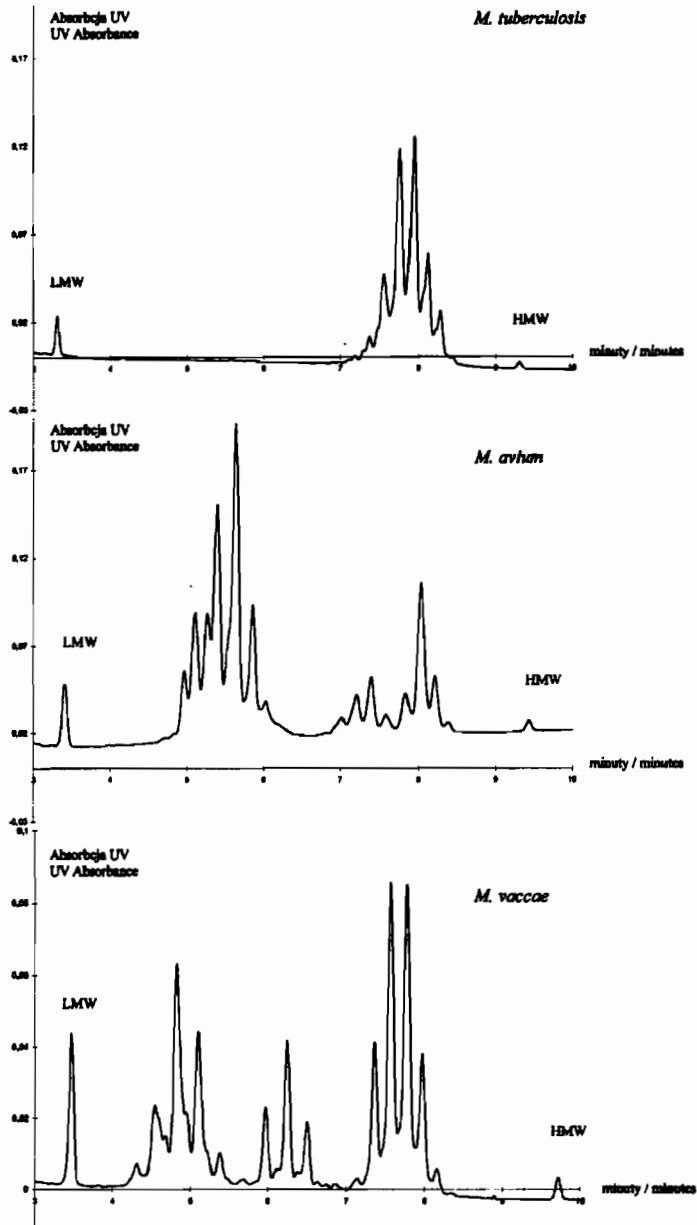
Wzory elucyjne szczepów referencyjnych z podłoża stałego L-J. W analizie wzorów elucyjnych kwasów mikołowych nie odnoszono się do klasycznego podziału prątków wg Runyon'a, lecz otrzymane chromatogramy klasyfikowano w zależności od ilości grup pików w celu ułatwienia ich wizualnego porównywania (Ryc. 1). Spośród szczepów referencyjnych, 13 miało jedną grupę, 12 – dwie grupy i 3 szczepy – trzy grupy pików (Tab. II).

Gatunki należące do kompleksu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* ATCC 27294, *M. bovis* ATCC 19210 i *M. microti* ATCC 19422), z wyjątkiem *M. bovis* BCG, mają wspólny wzór elucyjny z jedną grupą sześciu pików. Chromatogram *M. bovis* BCG ma również 6 pików, różni się jednak od wzoru dla *M. tuberculosis* complex przesunięciem w stronę krótszych RT. Względne RT dla *M. bovis* BCG zawierają się w przedziale od $0,768 \pm 0,005$ do $0,870 \pm 0,003$ (n=6), podczas gdy dla kompleksu *M. tuberculosis* przedział ten wynosi od $0,792 \pm 0,001$ do $0,890 \pm 0,001$ (n=6) (Ryc. 2). Wynik zgodny jest z piśmiennictwem (4), a HPLC jest jedyną metodą umożliwiającą jednoznaczne odróżnienie *M. bovis* BCG od *M. tuberculosis* complex.

Tabela II. Podział szczepów referencyjnych *Mycobacterium* ze względu na liczbę pików w profilu elucyjnym kwasów mikołowych.

Table II. Reference *Mycobacterium* stains according to number of peak clusters in elution profile of mycolic acids.

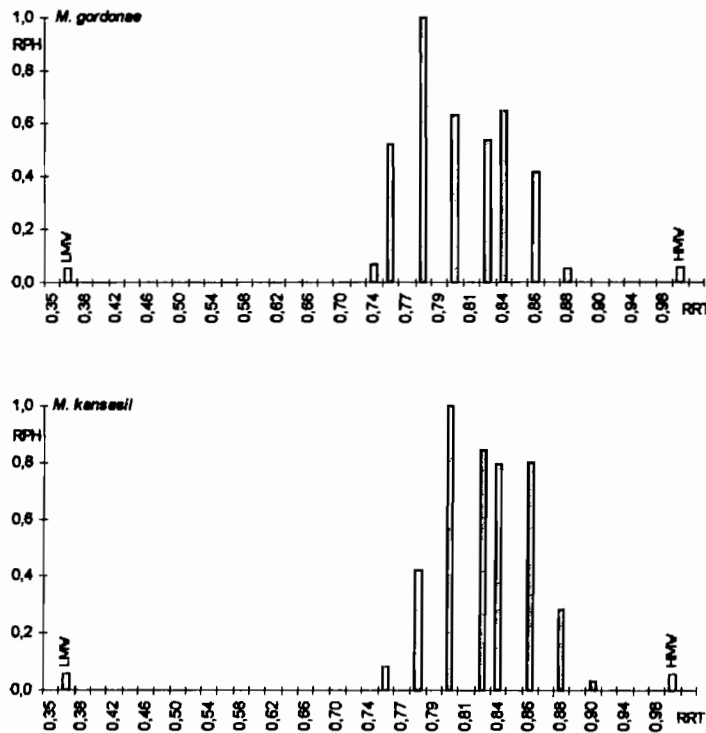
Jedna grupa pików Single-cluster species	Dwie grupy pików Double-cluster species	Trzy grupy pików Triple-cluster species
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. interjectum</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. bovis</i> – BCG	<i>M. celatum</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. chelonae</i>	
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. flavescens</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. hiberniae</i>	
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. intracellulare</i>	
<i>M. kansasii</i>	<i>M. neoaurum</i>	
<i>M. malmoense</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	
<i>M. marinum</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. microti</i>	<i>M. tokaiense</i>	
<i>M. triviale</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. tuberculosis</i>		



Ryc.1. Wybrane wzory elucyjne kwasów mikołowych *Mycobacterium* z jedną, dwiema i trzema grupami pików. LMW i HMW – standardy wewnętrzne, odpowiednio nisko- i wysokocząsteczkowy.

Fig. 1. Representative single-, double- or triple-cluster elution patterns of mycobacteria mycolic acids derived by HPLC. LMW and HMW – internal standards, low- and high molecular weight, respectively.

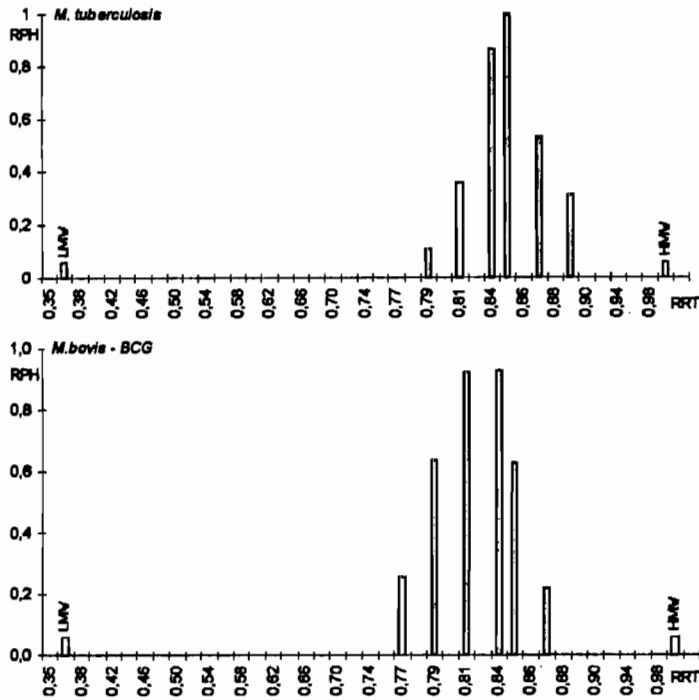
Kwasy mikołowe *Mycobacterium*



Ryc. 2. Porównanie względnej wysokości pików (RPH) oraz względnych czasów retencji (RRT) kwasów mikołowych szczepów referencyjnych *M. tuberculosis* i *M. bovis*-BCG. LMW i HMW – standardy wewnętrzne, odpowiednio nisko- i wysoko-cząsteczkowy.
 Fig. 2. Relative peak high (RPH) and relative retention time (RRT) of reference *M. tuberculosis* mycolic acids elution pattern in comparison with parameters of reference *M. bovis*-BCG one. LMW and HMW – internal standards, low- and high molecular weight, respectively.

Spośród najczęściej izolowanych w populacji polskiej MOTT, wzory elucyjne z jedną grupą pików mają: *M. kansasii* ATCC 12478 i *M. gordonae* ATCC 35758. Różnią się one od profilu elucyjnego *M. tuberculosis* complex względnymi czasami retencji, względnymi wysokościami pików, a przede wszystkim ilością pików, których jest po osiem. W rozróżnianiu *M. gordonae* i *M. kansasii* bierze się pod uwagę RRT pierwszego i ostatniego pików z grupy – dla *M. gordonae* są one niższe i wynoszą odpowiednio: $0,736 \pm 0,001$ i $0,876 \pm 0,001$ ($n=6$). Dla *M. kansasii* wynoszą odpowiednio: $0,758 \pm 0,002$ oraz $0,893 \pm 0,004$ ($n=6$). Drugą istotną różnicą jest fakt, że wysokości pików we wzorze *M. gordonae* są bardziej zróżnicowane niż we wzorze *M. kansasii* co znajduje odbicie w obliczeniach względnych wysokościach pików (Ryc. 3).

Chromatogramy *M. avium* ATCC 25591, *M. intracellulare* ATCC 13950 i *M. xenopi* ATCC 19250 mają po dwie grupy pików, różnią się więc zasadniczo od *M. tuberculosis* complex. W rozróżnianiu tych gatunków od siebie, zwraca



Ryc. 3. Porównanie względnej wysokości pików (RPH) oraz względnych czasów retencji (RRT) kwasów mikolowych szczepów referencyjnych *M. gordonae* i *M. kansasii*. LMW i HMW – standardy wewnętrzne, odpowiednio nisko- i wysoko-cząsteczkowy.

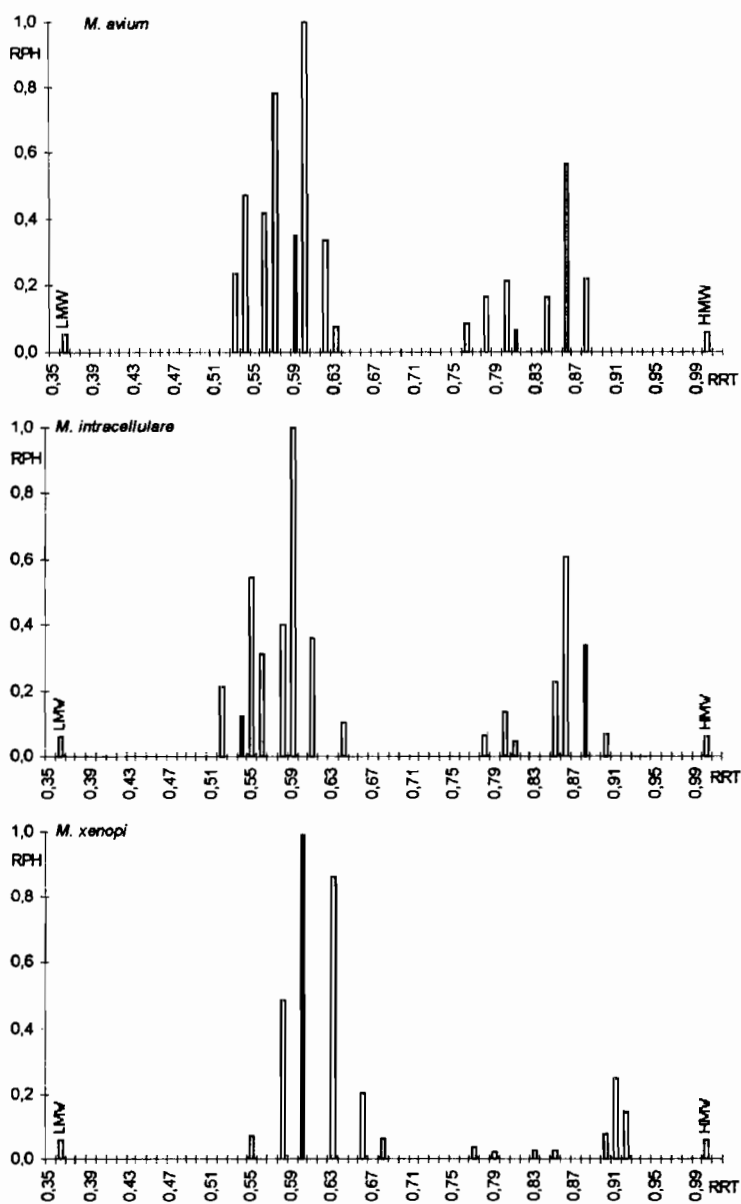
Fig. 3. Relative peak high (RPH) and relative retention time (RRT) of reference *M. gordonae* mycolic acids elution pattern in comparison to parameters of reference *M. kansasii* one. LMW and HMW – internal standards, low- and high molecular weight, respectively.

się szczególną uwagę na drugą grupę pików, tę o wyższych czasach retencji, gdyż różnice między gatunkami są tu wyraźniejsze niż w składzie eluujących się wcześniej kwasów mikolowych (Ryc. 4).

Wzory elucyjne szczepów referencyjnych z podłoża Middlebrooka 7H9.

Spośród 28 analizowanych szczepów referencyjnych, 17 wzorów elucyjnych kwasów mikolowych było identycznych dla obu stosowanych podłoży, w tym dla *M. tuberculosis* complex, *M. bovis* BCG, *M. kansasii* i *M. gordonae*. Można zauważyć tendencję, że gatunki syntetyzujące mniej zróżnicowane kwasy mikolowe, tzn. takie, których wzory elucyjne mają tylko jedną grupę pików, raczej zachowują swój wzór niezależnie od podłoża. Wyjątkiem jest *M. fallax*. Mycobacteria posiadające bogatą gamę kwasów mikolowych są bardziej wrażliwe na skład podłoża hodowlanego, w tym

Kwasy mikołowe *Mycobacterium*



Ryc. 4. Porównanie względnej wysokości pików (RPH) oraz względnych czasów retencji (RRT) kwasów mikołowych szczepów referencyjnych *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. xenopi*. LMW i HMW – standardy wewnętrzne, odpowiednio nisko- i wysoko-cząsteczkowy.
 Fig. 4. Relative peak high (RPH) and relative retention time (RRT) of reference mycolic acids elution patterns: the comparison of *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. xenopi*. LMW and HMW – internal standards, low- and high molecular weight, respectively.

sensie, że zmienia się skład ilościowy syntetyzowanych kwasów, przy raczej zachowanym składzie jakościowym. W konsekwencji różnice we wzorach elucyjnych szczepów z różnych podłoży dotyczą głównie RPH z jednocześnie najczęściej zachowaną ilością pików i RRT.

Podsumowanie. Dla wszystkich badanych szczepów referencyjnych hodowanych w warunkach standardowych, wzory elucyjne kwasów mikolowych są wysoce powtarzalne i zgodnie ze standardami opublikowanymi przez CDC (2). Wykonane doświadczenia pozwoliły na utworzenie, zgodnie z zaleceniami CDC, biblioteki wzorów elucyjnych kwasów mikolowych 28 szczepów referencyjnych z rodzaju *Mycobacterium*, która może być wykorzystana w rutynowym typowaniu prątków z hodowli stałej L-J lub płynnej Middlebrooka 7H9.

Pimiennictwo

1. Butler W.R., Kilburn J.O.: High-performance liquid chromatographypatterns of mycolic acids as criteria for identification of *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Mycobacterium smegmatis*. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 2094-8.
2. Butler W.R. i wsp. red.: Mycolic Acid Pattern Standards for HPLC Identification of Mycobacteria, U.S. Department of Health and Human Services 1999, <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/TB/maps.pdf>.
3. Butler W.R. i wsp., red.: Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria, U.S. Department of Health and Human Services 1996, <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/TB/hplc.pdf>.
4. Floyd M.M., Silcox V.A., Jones W.D. Jr., Butler W.R., Kilburn J.O.: Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by usng high-performance liquid chromatography of mycolic acids. J. Clin. Microbiol. 1992, 30, 1327-30.
5. Minnikin D.E., Minnikin S.M., Parlett J.H., Goodfellow M., Magnusson M.: Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. Arch. Microbiol. 1984, 139, 225-31.
6. Zwolska Z.: Mikrobiologia gruźlicy, red. Rowińska-Zakrzewska E.: Gruźlica w praktyce lekarskiej, PZWL, Warszawa 2000, 13-32.

Wpłynęła: 31.07.2001

Adres: Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii AM
02-097 Warszawa ul. S. Banacha 1a