

# Indagine sulle biovarianti enzimatiche del *Mycobacterium xenopi*

E. TORTOLI – M. T. SIMONETTI

*Laboratorio di Batteriologia e Virologia dell'Ospedale di Careggi  
USL 10/D, Firenze*

**RIASSUNTO:** Sono stati valutati, dal punto di vista dell'attività enzimatica (usando il sistema API-ZYM), oltre 50 ceppi di *Mycobacterium xenopi*. Pur essendo stati messi in evidenza 8 biotipi diversi, non è stato possibile dimostrare alcuna correlazione di questi con area geografica, sensibilità ai chemio-antibiotici e significatività clinica del ceppo isolato.

**SUMMARY:** Investigation of *Mycobacterium xenopi* biovars.

More than 50 *Mycobacterium xenopi* strains were evaluated enzymatically by the API-ZYM system and 8 biovars were recognized. No correlation of any biovar with geographic areas, antimicrobial susceptibility or clinical significance of the strains was found.

## Introduzione

Il *Mycobacterium xenopi* (MX), generalmente classificato all'interno del II gruppo di Runyon (micobatteri scotocromogeni), è un tipico microorganismo opportunistico: pur essendo infatti occasionalmente isolato da materiali biologici di soggetti sani, esso può dar luogo con una certa frequenza ad infezioni, soprattutto a livello polmonare, con quadri per certi versi sovrapponibili a quello tubercolare.

La distribuzione geografica di tale microorganismo risulta quanto mai disomogenea, si passa infatti da paesi con isolamenti sporadici, quali gli USA, ad altri in cui sono state descritte zone di endemia. Analogamente a quanto riscontrato in vari paesi europei (1,2,6,10), anche in Italia, nell'area fiorentina, è stata segnalata una zona caratterizzata da elevate percentuali di isolamento di MX (13).

Alla ricerca di eventuali marker da utilizzare a scopo epidemiologico si è pensato di indagare l'attività enzimatica di tale specie micobatterica.

Prendendo spunto da quanto fatto in precedenza da altri per il *Mycobacterium tuberculosis* (3,8), è stata quindi studiata, su oltre 50 ceppi di MX provenienti da campioni clinici, l'attività di 19 enzimi utilizzando il sistema API-ZYM (Bio Mérieux, Francia).

## Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 53 isolati di MX provenienti da altrettanti pazienti, per 13 di essi è stato possibile accertare la significatività clinica dell'isolamento mentre per i rimanenti il ruolo di patogeno del MX non è stato dimostrato.

I materiali di isolamento dei singoli ceppi erano in netta prevalenza (85%) di provenienza respiratoria (escreti o bronco-aspirati).

Dai trapianti su Lowenstein-Jensen conservati a +4°C sono state effettuate subcolture in tubi di Middlebrook 7H11 incubate a 37°C, in atmosfera contenente CO<sub>2</sub> al 5%, per almeno 6 settimane, es-

Tabella 1

Biovars enzimatici del *Mycobacterium xenopi*.

Biovars	ceppi		attività enzimatica (cupola API-ZYM) <sup>a</sup>					
	N°	%	7	8	9	10	12	16
A	22	41	+	+	-	-	+	+
B	15	28	+	+	+	-	+	+
C	10	9	+	+	-	-	+	-
D	2	4	+	+	+	-	+	-
E	1	2	-	-	-	-	+	-
F	1	2	+	+	+	+	+	+
G	1	2	+	+	-	-	-	-
H	1	2	+	+	-	-	-	+

<sup>a</sup> 7: cistina aril-amidasi; 8: tripsina; 9:  $\alpha$ -chiotripsina; 10: fosfatasi acida; 12:  $\alpha$ -galattosidasi; 16:  $\beta$ -glucosidasi.

sendo la crescita di tale specie particolarmente lenta.

L'identificazione degli stipiti come appartenenti alla specie MX era stata effettuata in precedenza utilizzando i sistemi convenzionali (9,12) e valutando anche i risultati dei test di identificazione per mezzo di un programma computerizzato (11). Le gallerie API-ZYM constano di 20 cupole di cui la prima è utilizzata come controllo negativo mentre le successive contengono altrettanti substrati liofilizzati per la messa in evidenza delle corrispondenti attività enzimatiche. Gli enzimi ricercati sono: fosfatasi alcalina, C4 esterasi, C8 esterasi-lipasi, C14 lipasi, leucina aril-amidasi, valina aril-amidasi, cistina aril-amidasi, tripsina,  $\alpha$ -chiotripsina, fosfatasi acida, naftolo-AS-BI-fosfoidrolasi,  $\alpha$ -galattosidasi,  $\beta$ -galattosidasi,  $\beta$ -glucuronidasi,  $\alpha$ -glucosidasi,  $\beta$ -glucosidasi, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasi,  $\alpha$ -mannosidasi e  $\alpha$ -fucosidasi.

La presenza dell'enzima corrispondente determina la liberazione dal substrato di un derivato del naftolo che viene poi evidenziato colorimetricamente mediante l'aggiunta di due idonei reagenti forniti dal Produttore: un tensioattivo (ZYM A) ed un sale di diazonio (ZYM B).

Prelevando con un tampone sterile l'intera patina batterica sviluppatasi in ciascun tubo di coltura sono state allestite altrettante sospensioni in acqua distillata sterile (3 ml) aventi torbidità pari almeno al punto 5 della scala McFarland. Ciascuna sospensione è stata poi distribuita, con una pipetta automatica, nelle singole cupole della galleria A-

PI-ZYM (65  $\mu$ l per ciascuna).

Dopo un'incubazione overnight a 37°C, all'interno di una apposita camera umida, ai singoli pozzetti della galleria sono state aggiunte due gocce di ciascuno dei due reagenti accessori. La lettura è stata effettuata ad occhio (dopo una esposizione di 5 min. ad un'intensa sorgente luminosa) per confronto col controllo negativo e utilizzando la scala colorimetrica fornita con il kit.

Tutti i test sono stati eseguiti in doppio a distanza di almeno 2 mesi a partire da differenti trapianti dello stesso ceppo, e nei casi in cui si è avuta discordanza, è stata eseguita una terza determinazione.

Partendo dall'osservazione che la maggioranza dei pazienti da cui è stato isolato il MX nel nostro laboratorio sono residenti in una ben definita area geografica (il triangolo avente come vertici la periferia occidentale di Firenze, Empoli e Prato), si è provveduto, nel tentativo di evidenziare eventuali correlazioni di qualche biovariante con tale entità geografica, a ripartire i singoli ceppi fra due raggruppamenti, denominati "a rischio" e "NON a rischio", a seconda che la residenza del paziente fosse collocata o meno all'interno dell'area suddetta.

## Risultati

Delle 19 attività enzimatiche 13 sono risultate inutilizzabili come marcatori in quanto: 7 sempre

positive (fosfatasi alcalina, C4 esterasi, C8 esterasi-lipasi, C14 lipasi, leucina aril-amidasi, fosfatasi acida e  $\beta$ -glucosidasi) e 6 sempre negative ( $\alpha$ -galattosidasi,  $\beta$ -galattosidasi,  $\beta$ -glucuronidasi, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasi,  $\alpha$ -mannosidasi e  $\alpha$ -fucosidasi).

In base ai risultati delle reazioni rimanenti è stato possibile identificare 8 biotipi diversi (Tabella 1).

Nessuna correlazione è stata messa in evidenza fra le singole biovarianti e la provenienza dei ceppi dalle aree "a rischio" o "NON a rischio"; e parimenti non significative sono risultate le differenze delle frequenze dei singoli biovars nell'ambito degli stipti responsabili di micobatteriosi e dei semplici colonizzatori. Neanche l'approfondimento dell'analisi, prendendo in considerazione, anzichè i biotipi, le singole reazioni enzimatiche, ha permesso di evidenziare correlazioni di tipo "ambientale" o collegamenti con la significatività clinica.

Risultati ancora una volta non significativi sono emersi dalla ricerca di eventuali correlazioni fra i singoli biotipi e la sensibilità dei ceppi ai farmaci testati nell'antibiogramma.

## Conclusioni

Numerose vie sono state tentate nella ricerca di marcatori microbiologici affidabili, impiegabili a scopo epidemiologico. Per quanto riguarda i micobatteri, fra i sistemi tradizionali i più studiati sono certamente quelli basati sulle tipizzazioni fagica e sierologica.

All'interno della specie MX sono stati descritti 4 fagotipi (5) ed un unico sierotipo (4); si tratta comunque di tecniche che per la loro complessità non sono utilizzabili al di fuori dei laboratori di ricerca.

L'approccio biochimico risulta, specialmente qualora si ricorra a sistemi del commercio quali API-ZYM, assai semplice ed è già stato tentato anche per i micobatteri limitatamente alla specie *Mycobacterium tuberculosis*; non risulta invece che sia mai stato impiegato per la specie MX.

Utilizzando le 19 reazioni enzimatiche evidenziabili con le gallerie API-ZYM, è stato possibile

individuare, fra i 53 stipti di MX testati, variabilità intraspecifica relativamente a 6 attività enzimatiche e ciò ha permesso di individuare 8 biotipi diversi.

Lo studio delle frequenze dei vari biotipi in riferimento alla zona di residenza del paziente o alla significatività clinica dell'isolamento non ha permesso di trovare alcuna correlazione. Praticamente scontata era invece la mancanza di qualsiasi rapporto fra biovars e sensibilità ai farmaci; il MX è infatti caratterizzato da un pattern di sensibilità assai omogeneo (Tabella 2) tanto che la tolleranza di certe molecole e la inibizione da parte di altre possono venir utilizzate anche a scopo identificativo.

**Tabella 2**

*Percentuali di resistenza del Mycobacterium xenopi a vari farmaci (saggio eseguito su terreno 7H11 utilizzando il metodo delle proporzioni).*

Farmaco ( $\mu$ g/ml)	% di resistenza
Ac. p-amminosalicilico (8)	30
Amikacina (6)	4
Ciprofloxacina (1)	0
Etambutolo (7,5)	100
Etionamide (10)	0
Isoniazide (0,2)	83
Isoniazide (1)	0
Kanamicina (6)	0
Norfloxacina (2)	33
Ofloxacina (1)	12
Rifampicina (1)	38
Streptomina (2)	7

Un lavoro di Moinard et al. (7) in cui è indagata la possibilità di impiegare il sistema API-ZYM per l'identificazione di varie specie micobatteriche, e che prende in esame fra l'altro anche 19 ceppi di MX, consente un, sia pur limitato, confronto di dati. Le concordanze fra i due studi interessano 14 test presenti nella galleria API-ZYM essendo, in entrambi: 6 negativi, 4 positivi e 4, sia pure con diverse percentuali di positività, variabili (tabella 3). Dei 5 rimanenti: 3 sono risultati costantemente positivi nella presente ricerca e variabili in quella di Moinard et al., mentre gli ultimi 2 erano variabili nella nostra indagine e negativi nel lavoro francese.

L'analisi di tali disomogenità mette in evidenza sia l'esistenza di altre biovarianti, in aggiunta alle 8 da noi ritrovate, sia la diversa distribuzione delle stesse nelle 2 situazioni ambientali.

Ulteriori indagini si rendono necessarie prima di poter dimostrare in maniera definitiva l'utilità a fini epidemiologici della tipizzazione biochimica nell'ambito della specie MX. L'estrema semplicità di esecuzione ed il costo contenuto costituiscono comunque, specialmente in confronto a tecniche certamente valide ma assai più complesse quali lo studio del RFLP o il fingerprinting plasmidico, dei presupposti da non sottovalutare in vista di un eventuale approfondimento dell'indagine.

**Tabella 3**

Percentuali di positività del *Mycobacterium xenopi* alle singole reazioni enzimatiche.

Attività enzimatica <sup>a</sup>	I <sup>b</sup>	II <sup>c</sup>
2. fosfatasi alcalina	100	26
3. C4 esterasi	100	100
4. C8 esterasi-lipasi	100	100
5. C14 lipasi	100	16
6. leucina aril-amidasi	100	100
7. valina aril-amidasi	98	21
8. cistina aril-amidasi	98	11
9. tripsina	34	11
10. α-chimotripsina	2	0
11. fosfatasi acida	100	47
12. naftolo-AS-BI-fosfoidrolasi	96	37
13. α-galattosidasi	0	0
14. β-galattosidasi	0	0
15. β-glucuronidasi	0	0
16. α-glucosidasi	74	0
17. β-glucosidasi	100	100
18. N-acetil-β-glucosamidasi	0	0
19. α-mannosidasi	0	0
20. α-fucosidasi	0	0

<sup>a</sup> la numerazione segue quella delle cupole della galleria API-ZYM.

<sup>b</sup> nel presente studio.

<sup>c</sup> nello studio di Moinard et al. (7).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Boisvert H.: *Mycobacterium xenopi* (Marks et Schwabacher 1965), mycobactérie scotochromogène, thermophile, dysgonique, éventuellement pathogène pour l'homme. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., (1965), 109, 447-453.
- 2) Bretey J., Boisvert H.: *Mycobacterium xenopi*, agent d'affections pulmonaires et "contaminant". Rev. Tuberc. Pneumol., (1969), 33, 337-148.
- 3) Casal R.M., Linares Sicilia M.J.: Preliminary investigation of *Mycobacterium tuberculosis* biovars. J. Clin. Microbiol., (1984), 20, 1015-1016.
- 4) Goslee S., Rynearson T., Wolinsky E.: Additional serotypes of *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium xenopi* determined by agglutination. Int. J. Syst. Bacteriol., (1976), 26, 136-142.
- 5) Gunnels J.J., Bates J.H.: Characterization and mycobacteriophage typing of *Mycobacterium xenopi*. Am. Rev. Respir. Dis., (1972), 105, 388-392.
- 6) Marks J., Schwabacher H.: Infection due to *Mycobacterium xenopi*. Br. Med. J., (1965), 1, 32-33.
- 7) Moinard D., Carbone B., Courtien A., Drugeon H.: Rapid identification of *Mycobacterium* species. Res. Microbiol., (1989), 140, 33-41.
- 8) Piersimoni C., Cagnoni G., Petrelli E., Arzeni D., Bornigia S., Guidi L., Sprovieri G., Scalise G.: Indagine preliminare sulle biovarianti del *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiologia Medica, (1988), 3, 119-120.
- 9) Roberts G.D., Koneman E.W., Kim Y.K.: *Mycobacterium*. 304-339. In: Balows A., Hausler W.J. Jr., Hermann K.L., Isenberg H.D., Shadomy H.J. (Eds.): Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, (1991).
- 10) Smith M.J., Citron K.M.: Clinical review of pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi*. Thorax, (1983), 38, 373-377.
- 11) Tortoli E., Boddi V., Penati V.: Development and evaluation of a program and probability matrix for the computer-aided identification of non tuberculous mycobacteria. Binary Comp. Microbiol., (1992), 4, 39-42.
- 12) Tortoli E., Simonetti M.T.: I micobatteri. Pagg. 59. Caleidoscopio, Genova, (1990).
- 13) Tortoli E., Simonetti M.T., Labardi C., Lopes Pegna A., Meli E., Stanflin N., Susini S.: *Mycobacterium xenopi* isolation from clinical specimens in the Florence area: review of 46 cases. Eur. J. Epidemiol., (1991), 7, 677-681..

1) Boisvert H.: *Mycobacterium xenopi* (Marks et Schwabacher 1965), mycobactérie scotochromo-