

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA

* CLINICA PEDIATRICA

** LABORATORIO BATTERIOLOGIA
USL 10/D - FIRENZE

UN INCONTRO COL *MYCOBACTERIUM MALMOENSE*

Deriu G.M.

Tortoli E.**

Massei F.*

Caroli G.

Key words: *Mycobacterium malmoense* - Cervical lymphadenitis - HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

SUMMARY — «A rare isolation of *Mycobacterium malmoense*».

The isolation, extremely rare in Italy, of a strain of *M. malmoense* from a lymphnode abscess in a child is reported here. We also describe the procedures used for its identification, with particular reference to HPLC of the cell wall mycolic acids.

RIASSUNTO — Dall'essudato di un ascesso linfonodale di un bambino è stato isolato un ceppo micobatterico caratterizzato da sviluppo stentato e da un comportamento colturale e biochimico di non facile inquadramento ai fini classificativi.

L'assegnazione del microorganismo in causa alla specie *Mycobacterium malmoense* è stata resa possibile dall'analisi del profilo cromatografico (in

HPLC) degli acidi micolici, che è risultato perfettamente identico a quello di un ceppo di riferimento.

La descrizione del caso è giustificata dalla opportunità di richiamare l'attenzione su una specie micobatterica che in Italia sembra attualmente eccezionale, mentre in altri Paesi viene segnalata in frequente associazione con affezioni respiratorie e con linfadenopatie.

Introduzione

Fra i micobatteri potenzialmente patogeni per l'uomo il *Mycobacterium malmoense* si va imponendo all'attenzione in varie aree geografiche per l'aumento di incidenza dei casi clinici ad esso associati. Nel corso dell'11^a Conferenza dell'International Working Group for Mycobacterial Taxonomy (Irvine, California, 1989), Jenkins (5), responsabile del Centro Nazionale inglese per i Micobatteri che ha sede a Cardiff, denunciò come segnale di sicuro interesse epidemiologico il forte contrasto tra la rarità dei ceppi assegnabili alla specie *M. malmoense* collezionati nel lungo periodo 1954-1980 e la notevole frequenza del riscontro di tale micobatterio nel solo anno 1988.

Nel sottolineare l'importanza del fenomeno, egli precisò che nessuna modifica era stata apportata nel frattempo ai procedimenti colturali di isolamento ed ai criteri identificativi.

Nella recente casistica quasi decennale (1985-1993) del Centro di Cardiff, cui fa capo la rete dei laboratori periferici di Sanità Pubblica operanti in Inghilterra, Galles e Nord Irlanda, il micobatterio in questione risulta infatti rappresentare l'1,8% degli «isolati» e collocarsi al 4° posto, distanziandosi non molto da *M. avium*/intracellulare, che ricorre con una frequenza del 4,9% ed è in testa alle classifiche degli agenti di micobatteriosi nell'uomo. Ma prescindendo dalle informazioni di interesse epidemiologico forniti da detto Centro, ammirevole per l'organizzazione del servizio, indicazioni analoghe si ricavano anche da altre fonti (Wayne et al., 1992).

Non essendo stato realizzato ancora nel nostro Paese un Centro di riferimento per i micobatteri, avviene purtroppo che notizie sui reperti di tali microrganismi, informazioni sulle specie associate ai vari processi morbosi e altri ragguagli clinico-epidemiologici restino silenti, per lo più intrappolati nella barriera di incomunicabilità fra laboratori e servizi di microbiologia clinica; ci tocca così rassegnarci a far riferimento ai dati frammentari che qualche volenteroso ricercatore affida alla pubblicazione su qualche rivista scientifica,

auspicabilmente di agevole reperibilità. In queste condizioni siamo portati a suggerire ai colleghi italiani che sarebbe opportuno consegnare alla letteratura la descrizione di ogni caso occorso alla loro osservazione.

Per parte nostra, la segnalazione di un caso, che ci è stato affidato in studio quasi un anno fa', ci pare interessante e doverosa oltre che come contributo epidemiologico, anche per richiamare l'attenzione sulle difficoltà colturali e identificative della specie micobatterica in causa e sugli altri aspetti che brevemente richiameremo.

Il *Mycobacterium malmoense* comparve alla ribalta tassonomica con tale denominazione nel 1977, quando Schröder e Juhlin (7) acquisirono dati sufficienti per elevare a dignità di specie alcuni ceppi preliminarmente assegnati al III° gruppo di Runyon, come micobatteri non fotocromogeni, provenienti da quattro pazienti svedesi (di Malmö e di Lund), con affezioni polmonari. Vennero descritte le diverse caratteristiche da prendere in considerazione ai fini diagnostico-differenziali e cioè la lentezza di crescita (6 settimane circa) su Loewenstein-Jensen (L-J), lo sviluppo disgonico, il dimorfismo delle colonie (alcune lisce e lucenti, altre piatte a margini sfumati e con sporgenza centrale, per cui vengono definite umbonate) e la tendenza alla microaerofilia.

Tutti i ceppi studiati da Schröder e coll. risultarono sensibili all'etambutolo, all'ethionamide, alla kanamicina e alla cicloserina; inoltre erano in grado di deaminare nicotinamide e pirazinamide, come pure di idrolizzare il Tween 80, che non viene invece scisso da *M. avium*/intracellulare e da *M. xenopi*.

Hoffner e coll. (3) nel 1991, riferirono che il *M. malmoense* veniva isolato con crescente frequenza da materiali clinici e lo definirono «il più comune agente causale di infezione micobatterica in Svezia». Essi raccomandavano, inoltre, numerosi accorgimenti da seguire per evitare il fallimento nella ricerca di questo micobatterio. Venne richiamata l'attenzione sulle seguenti osservazioni:

1) l'impiego di L-J addizionato di piruvato e a pH acido fra 6,0 e 6,5 come raccomandato da Katila e coll. (6), aumenta la possibilità di successo nell'isolamento di tale microrganismo;

2) il periodo di incubazione va protratto per almeno 8 settimane, secondo i suggerimenti di Ispahani e Baker (4);

3) la temperatura di incubazione raccomandabile per le colture di primo isolamento è tra 30 e 33°C, in accordo con quanto osservato da Grange e Yates (2);

4) il sistema BACTEC è significativamente più sensibile e rapi-

do per la ricerca di *M. malmoense* in materiale biotico, rispetto ai terreni solidi.

Ciò premesso, passiamo a riferire brevemente sul caso e sul ceppo microbico acido-resistente ad esso associato.

Materiali e metodi

Nell'ambito di un programma di accertamenti microbiologici finalizzati al riconoscimento dell'agente etiologico nei casi di linfadeniti laterocervicali acute e croniche che pervengono all'osservazione dei colleghi della Clinica Pediatrica dell'Università di Pisa, nel settembre 1993 ci fu inviato l'agoaspirato di un linfonodo colloquato in sede angolo-mandibolare destra, riscontrato ad un bambino di 6 a., in normale stato di immunocompetenza.

Il materiale biologico, oltre che utilizzato per l'allestimento di vetrini destinati all'esame microscopico diretto previa colorazione di Ziehl-Neelsen, fu inoculato senza preliminare decontaminazione nei seguenti terreni colturali solidi: L-J e M7H11 agar.

Le colture furono incubate rispettivamente a 30°C e a 37°C e tenute in osservazione per 60 gg.

In caso di reperto colturale positivo era previsto per l'identificazione dei microrganismi acido-resistenti il ricorso ad un set esteso di test biochimici, colturali e di inibizione selettiva, per poi passare a valutare i risultati mediante un programma computerizzato per l'identificazione dei micobatteri messo a punto da uno di noi (8).

Alle prove convenzionali è stato inoltre affiancato lo studio del profilo degli acidi micolici della parete; a tale scopo gli acidi grassi, una volta estratti con potassa alcolica dalle cellule micobatteriche cresciute su Middlebrook 7H11, sono stati derivatizzati a bromo-fenacil esteri e quindi evidenziati mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (1).

La strumentazione impiegata comprende un apparecchio HPLC Beckman, modello 126, con colonna a fase inversa (C18, mm 0,2 per cm 25) e un detector, mod. 166, settato ad una lunghezza d'onda di 254 nm (per il rilevamento dell'assorbimento dei raggi ultravioletti da parte dei bromo-fenacil-esteri); la gestione dello strumento e dei dati è affidata al software System Gold Beckman.

Le condizioni della HPLC prevedevano l'eluizione con gra-

diente di metanolo (M) e cloruro di metilene (CM) passando, in un min, da 90% di M e 10% di CM, a 75% di M e 25% di CM e quindi, linearmente in 20 min, a 25% di M e 75% di CM.

Risultati

Dalla semina dell'essudato linfonodale, che all'osservazione microscopica diretta previa colorazione di Ziehl-Neelsen era risultato negativo, si pervenne dopo un mese e mezzo all'isolamento di un ceppo microbico acido-resistente, apigmentato, caratterizzato da crescita disgonica su L-J, e meno difficoltosa nei tubi di Middlebrook 7H11 agar.

Le risposte che il microrganismo isolato diede alla ricca serie di saggi per l'identificazione sono presentate nella Tabella 1, e

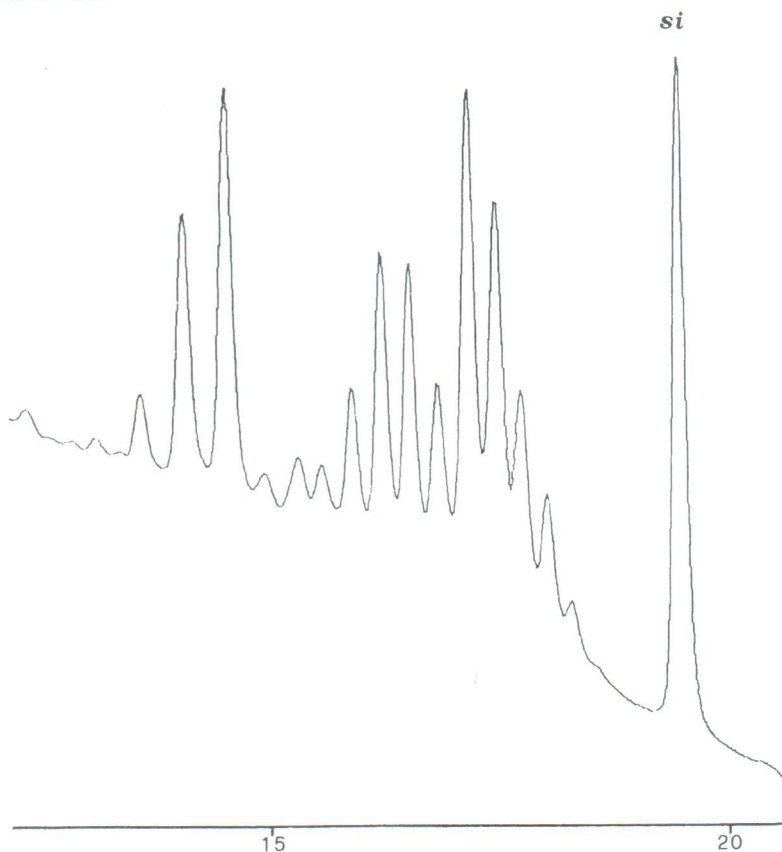
TABELLA 1.

Risultati dei test di identificazione eseguiti sull'isolato di *M. malmoense*.

Niacina	—
Riduzione dei nitrati	—
Catalasi dopo 20' a 68°C	+
Catalasi > 45 mm	—
Fotocromogenicità	—
β-glucosidasi	—
Idrolisi del Tween 80 (10 giorni)	+
Velocità di crescita	lenta
Crescita a 25°C	+
Crescita a 45°C	—
MacConkey	—
Riduzione del tellurito	—
Ariolfatasi	—
Morfologia delle colonie	liscia
Ureasi	+
Resistenza a:	
MaCl (5%)	—
ac. p-nitrobenzoico (μ/ml)	+
Idrazide dell'acido tiofen-carbossilico (5 μ/ml)	—
Tiacetazone (10 μ/ml)	+
Idrossilamina (500 μ/ml)	+
Isoniazide (1 μ/ml)	+
Oleato (250 μ/ml)	—

corrispondono tipicamente a quelle esibite da un ceppo di *Mycobacterium malmoense* usato per comparazione.

Ulteriore sostegno all'assegnazione del ceppo isolato alla specie *M. malmoense* è derivato dall'analisi degli acidi micolici: l'originale profilo cromatografico riportato nella Figura 1 ha mostrato completa sovrapposizione a quello di un ceppo di controllo così classificato.



si: standard interno

Figura 1 - Profilo cromatografico (HPLC) dei bromo-fenacil esteri degli acidi micolici di *M. malmoense*.

Discussione

L'occasione di incontro col *Mycobacterium malmoense*, offerta dal caso di linfadenopatia qui riferito, ci ha messo in contatto con

le difficoltà tecniche di isolamento di tale microrganismo, ben sottolineate da Hoffner e coll. (3), i quali hanno ad esse imputato i motivi per giudicarlo come «an easily missed pathogen».

Questi stessi autori, proprio in base ai risultati colturali conseguiti impiegando rispettivamente il L-J medium ed il sistema radio-metrico BACTEC per 17 campioni provenienti da linfadeniti cervicali in bambini, portano una chiara dimostrazione della possibilità di fallimento nella rivelazione dell'agente etiologico quando si fa ricorso al solo L-J: l'abbinamento delle due procedure viene pertanto dichiarato irrinunciabile, proprio per non rischiare di perdere un microrganismo «fastidioso» quale è appunto il *Mycobacterium malmoense*.

Per quanto ci compete, possiamo aggiungere che in aree geografiche, come quella italiana, in cui l'isolamento del *M. malmoense* sembra rivestire per ora carattere di eccezionalità, l'identificazione del germe mediante le sole tecniche convenzionali, anche quando, come nel caso qui riportato, le risposte siano state sostanzialmente concordanti, non rimane scevra da incertezze. La disponibilità di un ceppo di *M. malmoense* isolato anni or sono da uno di noi (T.E.) e identificato presso l'Istituto Pasteur di Parigi ha permesso, in questa circostanza, di mettere da parte ogni perplessità classificativa. Elemento dirimente è stato infatti il profilo cromatografico degli acidi micolici suggestivamente identico per i due ceppi messi a confronto e assolutamente originale, perchè inconfondibile rispetto a tutti quelli riportati in letteratura per altre specie micobatteriche.

Acquisita così la certezza sul piano tassonomico, ci pare d'obbligo pronunciarsi sul significato clinico-epidemiologico da attribuire al reperto microbiologico. In proposito sappiamo che il *Mycobacterium malmoense* non è stato ritrovato finora in materiali ambientali, risultando invece associato sempre all'ospite umano con attitudine talvolta alla colonizzazione non infettiva delle vie respiratorie, ma per lo più come un autentico «parassita» dotato di aggressività. La letteratura internazionale citata in questa nota lo accredita infatti come agente patogeno implicato non solo in forme bronco-polmonari, ma soprattutto in linfadenopatie infantili; la ricca casistica che in essa è riportata ci fa propendere a riconoscergli ruolo etiologico anche nel nostro caso. Non disponiamo, peraltro, di alcun indizio in merito alla sorgente d'infezione e alle modalità di contagio.

Torkko P., Martikainen P.J. & Katila M-L.), partecipanti al 15th Annual Meeting della European Society for Mycobacteriology (Atene, 26-30 giugno 1994), hanno riferito sul ritrovamento di *M. malmoense* in campioni di acqua con particolari caratteristiche fisiche e chimiche, prelevati da due ruscelli. Gli autori ritengono che anche per tale micobatterio si possa invocare un habitat ambientale.

Bibliografia

- 1) Butler W.R., Jost K.C., Kilburn J.O. (1991): Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2468-2472.
- 2) Grange J.M., Yates M.D. (1988): Mycobacterial culture: what temperature? *Lancet* i, 534-535.
- 3) Hoffner S.E., Henriques B., Petrini B., Kallenius G. (1991): *Mycobacterium malmoense*: an easily missed pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 2673-2674.
- 4) Ispahani P., Baker M. (1988): Mycobacterial culture: how long? *Lancet* i, 305.
- 5) Jenkins P.A. (1989): intervento all'11th Conference on the genus *Mycobacterium* of the INGM. In: *Forum Mycobacteriorum* (informal medium of international communication among students of mycobacteria). N. 44 (gentilmente fornito da Wayne L.G.).
- 6) Katila M.L., Mattilla J., Brander E. (1989): Enhancement of growth of *Mycobacterium malmoense* by acidic pH and pyruvate. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 8, 998-1000.
- 7) Schröder K.H., Juhlin I. (1977): *Mycobacterium malmoense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 241-246.
- 8) Tortoli E., Boddi V., Penati V. (1992): Development and evaluation of a program and probability matrix for the computer-aided identification of non-tuberculous mycobacteria. *Binary*, 4, 200-203.