

Mycobacterium avium: varianti morfologiche e problematiche relative

E. Tortoli, M.T. Simonetti, *D. Dionisio

*Laboratorio di Batteriologia e Virologia, *Divisione di Malattie infettive - Ospedale di Careggi, USL 10/D - Firenze*

Riassunto. Ben nota è la caratteristica del *M. avium* di presentare più varianti morfologiche. Un ceppo di *M. avium* isolato da un paziente affetto da AIDS ha dato luogo in coltura a due tipi di colonie. Di questi, mentre uno (A) si colloca nell'ambito della variante "liscia opaca", l'altro (B) risulta difficilmente inseribile in una delle morfologie accettate. Particolarmente degna di attenzione risulta la forma delle cellule batteriche: corte ed omogeneamente alcool-acido resistenti, in A; allungate, ramificate ed "a bande", in B. Il saggio della sensibilità, eseguito col metodo della MIC, ha evidenziato notevoli differenze con resistenze più elevate nella variante A.

Abstract. *Mycobacterium avium*: problems concerning the morphological variants.

Unpigmented and pigmented colonial variants often grow from *M. avium* isolates. A strain of *M. avium* isolated from a patient (blood culture) with AIDS appeared to give rise, on agar media, to two different colony types. Of these, as the first (A) can be considered a "smooth opaque" variant, the latter (B) does not seem to match any of the other three known colony types. Cell morphology is however, in our opinion, the most remarkable differential characteristic: short strongly alcohol-acid resistant bacilli constitute in fact the type A colonies, while members of type B are long branching rods with banded alcohol-acid resistance. Susceptibility testing showed more elevated MICs in colonial variant A.

Introduzione

Il reperto di infezioni disseminate dovute a micobatteri del *Mycobacterium avium complex* (MAC) in soggetti affetti da AIDS è un evento oggi assai frequente, tanto che in letteratura le segnalazioni al riguardo sono ormai numerosissime (1,2,4-9,11,13, 25-27).

Sebbene in Italia, ed in Europa in genere, prevalgano ancora, in tali soggetti, gli isolamenti di *Mycobacterium tuberculosis* (3), il ritrovamento, particolarmente in emocolture, di micobatteri appartenenti al MAC non è eccezionale. Va segnalato semmai che a differenza di quanto si verifica negli USA, dove (9) quasi il 90% degli stipiti di MAC isolati da pazienti sofferenti di AIDS è caratterizzato da colo-

nie pigmentate, gli isolamenti nostrani sono costituiti da ceppi che presentano l'aspetto tipico, cioè non pigmentato.

Il recente isolamento nel nostro Laboratorio di uno stipite di *M. avium* dal sangue di un soggetto immunodeficiente ha richiamato la nostra attenzione su alcune caratteristiche di tale microrganismo forse non sufficientemente divulgate.

Materiali e metodi

Il ceppo in esame è stato isolato da un paziente affetto da AIDS (stadiazione HIV IV C1) ricoverato presso la Divisione di Malattie Infettive dell'Ospedale di Careggi di Firenze. In tale soggetto sono risultate positive per micobatteri 7 delle 8 emocolture eseguite ed isolamento di bacilli alcool-acido resistenti si è avuto anche da un campione di feci.

Il sangue, trattato col metodo della lisi-centrifugazione (Isolator, Du Pont-Merck) è stato seminato su provette di Lowenstein-Jensen incubate a 37° e 45°C e su piastre di Middelbrook 7H10 agar (7H10) incubate a 37°C in termostato a CO₂ (5%).

L'identificazione è stata eseguita utilizzando un set di 23 prove biochimiche e culturali (19,22) i cui risultati sono stati valutati anche mediante un programma computerizzato per l'identificazione dei micobatteri (21). In aggiunta è stato eseguito il test di ibridizzazione degli acidi nucleici con DNA probes specifiche per *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. tuberculosis complex* (Gen-Probe, San Diego, CA).

Il saggio della sensibilità ai farmaci è stato eseguito, col rilevamento della MIC, su piastre di 7H10 addizionate con diluizioni scalari per raddoppio di: Ciproflossacina (da 0,5 a 16 mcg/ml), Clofazimina (da 0,06 a 2), Enossacina (da 5 a 160), Etambutolo (da 5 a 40), Etionamide (da 2,5 a 20), Isoniazide (da 0,25 a 4), Oflossacina (da 5 a 80), PAS (da 0,5 ad 8), Rifampicina (da 0,62 a 40) e Streptomina (da 2,5 a 20).

Per valutare l'eventuale interconvertibilità delle varianti morfologiche sono stati eseguiti trapianti settimanali di colonie isolate e le piastre di 7H10 sono state osservate bisettimanalmente al microscopio (100x).

Risultati

Lo sviluppo di colonie di bacilli alcool-acido resistenti si è avuto nelle colture primarie, sia su Lowenstein-Jensen (a 37° e 45°C) che sui terreni sintetici, dopo un periodo medio di incubazione di 25 gg. Nei trapianti successivi su piastre di 7H10 è stato possibile individuare due diversi tipi di colonie entrambe non pigmentate.

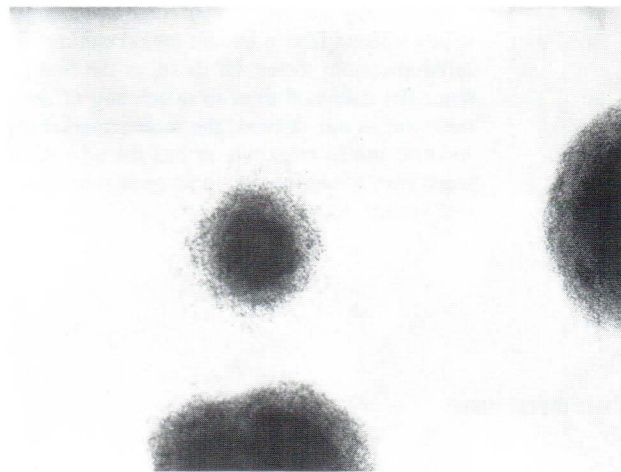
Figura 1. Colonia del tipo A, si nota l'ampia lobatura che circonda il corpo centrale rilevato (100x).



La prima di tali varianti fenotipiche (A), facilmente sospensibile in acqua, caratterizzata da consistenza cremosa, colorito biancastro, colonie rilevate circon-

date da una frangia di larghi lobi, è senz'altro da collocare all'interno del tipo comunemente noto in letteratura come "liscio opaco" (fig. 1). Più arduo risulta invece l'inserimento, in una delle tre rimanenti morfologie classicamente descritte per il *M. avium*, della seconda variante (B), che presenta sospensibilità, consistenza e colorito analoghi alla precedente, ma contorno perfettamente circolare da cui si dipartono, nelle forme giovani, estensioni di tipo rizoide mancanti poi totalmente nelle forme mature (fig. 2). Eliminata infatti, per ovvi motivi la variante pigmentata, l'attribuzione al tipo "rugoso" sembra incompatibile con la consistenza cremosa, la facile sospensibilità in acqua nonché con l'aspetto macroscopico delle colonie, e ugualmente non proponibile sembra l'inserimento nel tipo "liscio trasparente" per l'assoluta non-trasparenza e per la caratteristica di maggior resistenza che tali colonie dovrebbero presentare in confronto alle "liscie opache" (10).

Figura 2. Colonia del tipo B circondata da una frangia di ramificazioni rizoidiformi e totalmente priva di lobi (100x).



Anche la velocità di crescita contribuisce a differenziare le due varianti risultando sensibilmente più rapida nella A rispetto alla B.

In preparati microscopici eseguiti con la colorazione di Ziehl-Neelsen entrambi i tipi di colonie sono risultati formati da batteri alcool-acido resistenti, ma mentre gli elementi delle colonie A presentano morfologia coccobacillare (fig. 3) quelli delle colonie B sono caratterizzati da struttura assai allungata, sovente ramificata, e presentano una tingibilità irregolare tale da conferire alle cellule un aspetto zebraato o "a bande" (fig. 4).

Le due varianti isolate mediante passaggi su 7H10,

Figura 3. Bacilli a morfologia tozza che costituiscono le colonie di tipo A (1000x).

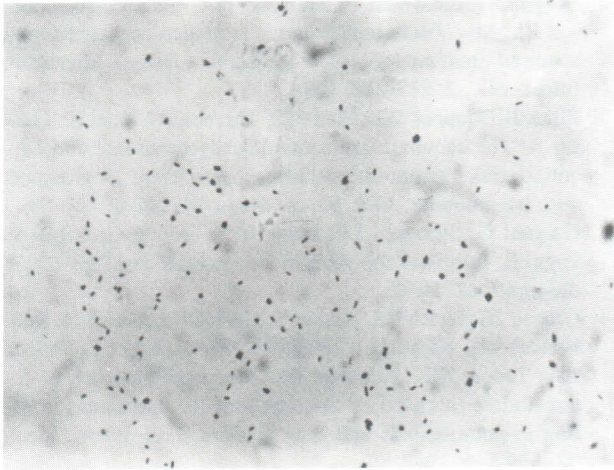


Figura 4. Bacilli ramificati e "bandeggiati" che costituiscono le colonie di tipo B (1000x).



sono state identificate in base ai tests biochimici e colturali tradizionali come appartenenti al MAC. Soltanto 3 delle 23 prove (riduzione del tellurito, crescita a 45°C e tolleranza all'oleato) hanno dato risultati discordanti (tabella 1) ma ciò non ha influenzato il livello di probabilità dell'identificazione, pari al 100% per le colonie A ed al 99,66% per le B.

Il test con i DNA probes ha permesso di attribuire definitivamente alla specie *M. avium* entrambi i tipi di colonie, con percentuali di ibridizzazione del 48% per le A e del 42% per le B; entrambi sono peraltro risultati negativi (con percentuali di ibridizzazione sempre inferiori al 2%) con le sonde per *M. intracellulare* e per *M. tuberculosis complex*.

La determinazione della MIC ha evidenziato, per 8 dei farmaci testati, una maggior sensibilità, in qualche caso assai accentuata, della variante B (tabella 2).

Dopo 15 passaggi su 7H10 non è stato possibile individuare alcun segno di interconvertibilità delle due morfologie coloniali.

Tabella 1. Risultati dei tests di identificazione nei due tipi di colonie.

	colonie A	colonie B
niacina	-	-
riduzione nitrati	-	-
catalasi	+	+
catalasi 68°C	+	+
pigmento al buio	-	-
pigmento alla luce	-	-
idrolisi Tween 5gg.	-	-
idrolisi Tween 10gg.	-	-
catalasi >45mm	-	-
tolleranza NaCl	-	-
velocità di crescita	lenta	lenta
crescita 25°C	+	+
crescita 45°C	+	-
crescita Mc Conkey	-	-
riduzione tellurito	+	-
arilsolfatasi	-	-
morfologia colonie	L	L*
ureasi	-	-
tolleranza TCH	+	+
tolleranza tiacetazone	+	+
tolleranza idrossil. cloridr.	+	+
tolleranza isoniazide	+	+
tolleranza oleato	+	-
tolleranza ac. p-nitrobenzoico	+	+

Tabella 2. MIC (mcg/ml) dei due tipi di colonie.

	colonie A	colonie B
ciprofloxacina	16	2
clofazimina	2	1
enossacina	80	40
etambutolo	10	10
etionamide	20	10
isoniazide	4	4
oflossacina	40	20
ac. p-aminosalicilico	4	<0,5
rifampicina	2,5	0,62
streptomina	>20	<2,5

Discussione

Svariati sono gli studi (10,12,15-17,20,23) relativi alla caratteristica dei micobatteri appartenenti al MAC di dar luogo a varianti morfologiche fra loro interconvertibili. Il dimorfismo riscontrato nel ceppo in esame non sembra tuttavia sovrapponibile a quanto descritto in letteratura tanto che entrambe le varianti, pur chiaramente distinte, possono a nostro avviso essere inserite esclusivamente nel tipo "liscio opaco" rispetto al quale non presentano caratteristiche incompatibili.

Anche per quanto riguarda la differenza di sensibilità ai farmaci, la ben nota maggior sensibilità della variante "opaca" rispetto a quella "trasparente" (10,20) non giustifica quanto rilevato nel caso in esame.

È comunque la morfologia bacillare, così diversa nelle due varianti coloniali, il carattere che per qualche tempo ha suscitato la nostra perplessità. La presenza di forme micobatteriche ramificate, a parte un rapido cenno sul Bergeys Manual, è infatti ignorata dai più autorevoli testi di microbiologia (18,19,24) e solo Winn (23), fra i lavori da noi consultati, segnala la presenza di tali morfologie in tessuti di polli infettati con la variante "liscia rilevata" (=liscia opaca). Tale caratteristica potrebbe infatti essere fonte di errore indirizzando il microbiologo verso l'ipotesi dell'appartenenza del ceppo al genere *Nocardia*, ipotesi peraltro apparentemente avvalorata dalla capacità dello stipite in questione (ma da noi verificata anche per altri ceppi di *M. avium* di collezione) di crescere anche su agar Sabourad.

La presenza in tale morfologia, di disomogeneità che conferiscono alla cellula micobatterica una bandeggiatura regolare potrebbe a sua volta essere fuorviante qualora fosse interpretata come la ben nota caratteristica "zebratura" tipica della specie *M. kansasii* (19).

Conclusioni

A nostro avviso la specie *M. avium* presenta ancora caratteristiche non del tutto note o quantomeno scarsamente conosciute anche dagli addetti ai lavori, e queste, se non adeguatamente valutate, possono essere fonte di errori a livello di identificazione o di determinazione della sensibilità.

Bibliografia

- Berlin OG, Zakowski P, Bruckner DA, Clancy MN, Johnson BL. *Mycobacterium avium*: a pathogen of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2, 213-218, 1984.
- Elliot JL, Hoppes WL, Platt MS, Thomas JG, Patel IP, Gansar A. The acquired immunodeficiency syndrome and *Mycobacterium avium*-intracellulare bacteremia in a patient with haemophilia. *Ann. Intern. Med.*, 98, 290-293, 1983.
- Gargani G, Signorini LF, Mandler F, Genchi C, Rigoli E, Faggi E. Infezioni opportunistiche in corso di AIDS. *Caleidoscopio*, 47, 1990.
- Greene JB, Sidhu GS, Leasin S, Levine SF, Masur H, Simberkoff MS, Nicholas P, Good RC, Zolla-Pazner S, Pollock AA, Tapper MC, Holzman RS. *Mycobacterium avium*-intracellulare: a cause of disseminated life threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann. Intern. Med.*, 97, 539-546, 1982.
- Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, Ford EG, Midura TF, Janda JM. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J. Infect. Dis.*, 160, 1037-1041, 1989.
- Hawkins CC, Gold JWM, Whimbley E, Kiehn TE, Brannon P, Cammarata R, Brown AE, Armstrong D. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 105, 184-188, 1986.
- Horsburgh CR, Cohn DL, Roberts RB, Masur H, Miller RA, Tsang AY, Iseman MD. *Mycobacterium avium*-M. intracellulare isolates from patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30, 955-957, 1986.
- Kiehn TE, Edwards FF. Rapid identification using a specific DNA probe of *Mycobacterium avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1551-1552, 1987.
- Kiehn TE, Edwards FF, Brannon P, Tsang AY, Maio M, Gold JWM, Whimbley E, Wong B, McClatchy JK, Armstrong D. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients; diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 168-173, 1985.
- Kuze F, Uchihira F. Various colony-formers of *Mycobacterium avium*-intracellulare. *Eur. J. Respir. Dis.*, 65, 402-410, 1984.
- Macher AM, Kovacs JA, Gill V, Roberts GD, Ames J, Park CH, Straus S, Lane HC, Parrillo JE, Fauci AS, Masur H. Bacteremia due to *Mycobacterium avium*-intracellulare in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 99, 782-785, 1983.
- Moehring JM, Solotorowsky MR. Relationship of morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the non-photocromogens. *Am. Rev. Respir. Dis.* 92, 704-716, 1965.
- Nussbaum JM, Dealist C, Lewis W, Heseltine PNR. Rapid diagnosis by buffy coat smear of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 631-632, 1990.

14. Runyon EH, Wayne LG, Kubica GP. Family II: Mycobacteriaceae Chester 1897. In: Buchanan RE, Gibbons NE, Eds: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Comp. - Baltimore, 681-701, 1974.
15. Saito H, Tomioka H. Susceptibilities of transparent, opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 400-402, 1988.
16. Schaefer WB, Davis CL, Cohn ML. Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 102, 499-506, 1970.
17. Schaefer WB, Olitzki AL, Davis CL, Cohn ML. Comparative pathogenicity of transparent and opaque variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Bacteriol. Proc.* 108, 1968.
18. Smith DW. *Mycobacteria*. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, Eds.: *Medical microbiology and infectious diseases*. W.B. Saunders Company - Philadelphia, 416-424, 1981.
19. Sommers HM, Good R. *Mycobacterium*. In: Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ Jr, Shadomy HJ, Eds.: *Manual of clinical microbiology*. 4th ed. American Society for Microbiology - Washington, 216-248, 1985.
20. Stormer RS, Falkinham III JO. Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2459-2465, 1989.
21. Tortoli E. Computer aided identification of mycobacteria: a prototype of software to interpret the results of cultural and biochemical tests. *Microbiologia Medica* 5, 60-63, 1990.
22. Wayne LG, Krichevsky MI, Portyrata D, Jackson CK. Diagnostic probability matrix for identification of slowly growing mycobacteria in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 722-729, 1984.
23. Winn WA, Petroff SA. Biological studies of the tubercle bacillus: II. A new conception of the pathology of experimental avian tuberculosis with special reference to the disease produced by dissociated variants. *J. Exp. Med.*, 57, 239-276, 1933.
24. Wolinsky E. *Mycobacteria*. In: Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberh HS, Wood WB, McCarty M, Eds.: *Microbiology*, 2nd ed. Harper & Row Publishers Inc. - Philadelphia, 723-742, 1980.
25. Wong B, Edwards FF, Kiehn TE, Whimbley E, Donnelly H, Bernard EM, Gold JWM, Armstrong D. Continuous high-grade *Mycobacterium avium*-intracellulare bacteremia in patients with the acquired immuno deficiency syndrome. *Am. J. Med.*, 78, 35-40, 1985.
26. Young LS, Inderlied CB, Berlin OG, Gottlieb MS. Mycobacterial infections in AIDS patients, with emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev. Infect. Dis.*, 8, 1024-1033, 1986.
27. Zakowski P, Figiel S, Berlin OG, Johnson BL Jr. Disseminated *Mycobacterium avium*-intracellulare infection in homosexual new dying of acquired immunodeficiency. *J. Am. Med. Assoc.*, 248, 2980-2982, 1982.