

## MICOBATTERI

## Ulceri del Buruli: la "nuova lebbra" Africana. Isolamento e identificazione di *M. ulcerans* in prelievi biopistici provenienti da pazienti del Benin

**Danila Costa, Enrico Tortoli<sup>2</sup>, Dorothy Passidomo, Vittorio Gaudiomonte, Anna Grimaldi, Giovanni Ostuni<sup>1</sup>, Francesco Sisto<sup>1</sup>, Valeria Navach<sup>1</sup>, Michele Quarto**

Laboratorio Micobatteri, U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica. A.O. Policlinico Bari

<sup>1</sup> U.O. di Chirurgia plastica ricostruttiva Osp. A.O. Policlinico Bari

<sup>2</sup> U.O. di Microbiologia e Virologia A.O. Careggi Firenze

**Key words:** Buruli ulcer, *Mycobacterium ulcerans*

**Buruli ulcer: direct detection and identification of *Mycobacterium ulcerans* from bioptic specimens of African patients**

### SUMMARY

Buruli ulcer, caused by *Mycobacterium ulcerans*, a slow growing mycobacterium which classically infects the skin and the subcutaneous tissues generating indolent ulcers, is, after tuberculosis and leprosy, the third most common mycobacterial infection and has emerged as an important cause of human disease in at least 32 tropical and subtropical countries. The disease initially manifests a painless swelling in the skin and progresses to skin ulceration. Because of the lack of a specific vaccine and the inefficacy of antibiotic therapies, the current treatment is surgical excision. Early diagnosis and treatment prevent complications and therefore, a prompt and accurate diagnosis is crucial, but difficult to perform in countries with limited resources.

In this paper we describe the mycobacteriological diagnosis on samples obtained from patients who underwent plastic-reconstructive surgery in a hospital in Zinvè, Benin (West Africa).

*M. ulcerans* was isolated from 19/32 subjects at the mycobacteriology laboratory of the Institute of Hygiene, University of Bari, Italy, 10-15 days after sampling. The identification of *M. ulcerans* was performed with a panel of tests for conventional identification, including biochemical analyses (niacin, nitrate reduction, catalase at 68°C, Tween hydrolysis, and urease), cultures (growth at 32, 37, and 45°C), and inhibition studies (tolerance of 5% NaCl and thiophenecarboxylic acid) as well as with INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 and confirmed with Chromatographic Analysis of Cell Wall Mycolic Acid (high-performance liquid chromatography).

Our results demonstrate that, even on samples collected in distant sites and analyzed after 10-15 days, the conventional phenotype identification confirmed by molecular testing and HPLC resulted in an accurate identification of such a devastating and relatively rare mycobacterium as *M. ulcerans* which had never been previously isolated in Italy.

### INTRODUZIONE

Malattia infettiva della pelle, l'ulcera del Buruli detta anche Ulcera di Bairnsdale o ulcera di Daintree, è la terza infezione micobatterica più comune dopo la tubercolosi e la lebbra.

La descrizione dei primi casi risale al 1897 nel Buruli, in Uganda, da parte di Sir Robert Cook, mentre l'agente eziologico responsabile, il *M. ulcerans*, è stato identificato e classificato nel 1948 da Mac Callum in Australia (1, 2).

*M. ulcerans*, a differenza degli altri micobatteri, produce una esotossina necrotizzante (un micolatone) con azione immunosoppressiva locale che distrugge i tessuti (in particolar modo le cellule adipose) e blocca i capillari (2, 3). Nessuna parte del corpo è immune anche se le lesioni colpiscono

prevalentemente gli arti, interessando una fascia d'età inferiore ai 15 anni (range 2-14).

La malattia, si manifesta con noduli, papule, placche o edemi non dolenti che evolvono in ulcere con margini sfumati e che spesso portano a sequele invalidanti, talvolta con coinvolgimento osseo (osteomielite). L'ulcera del Buruli può presentare quindi manifestazioni cliniche diverse:

- una forma attiva (ulcerativa o non ulcerativa), dove l'esame istologico delle ulcere rivela necrosi non caseosa specialmente del tessuto adiposo, con infiltrazione di mononucleati, e con assenza di granulociti finché non intervengono sovrainfezioni batteriche;
- una forma inattiva dovuta a pregresse infezioni, caratterizzata da cicatrici stellate con o

senza sequele (deformità o amputazioni). La sintomatologia non dolorosa, spiega la mancanza di trattamenti tempestivi per la cura della malattia (2, 3). I farmaci antitubercolari classici non sembrano efficaci; la suscettibilità del micobatterio *in vitro* è maggiore di quella *in vivo*; tuttavia recenti studi sembrano suggerire una qualche utilità, solo nelle fasi precoci, di una terapia combinata con Amikacina, Rifampicina, Claritromicina o Azitromicina (4). La strategia terapeutica principale, attualmente, è quella chirurgica plastico-ricostruttiva. L'escissione delle lesioni preulcerative risulta curativa nella maggior parte dei casi, e per la loro guarigione, come ausilio, viene applicato il calore locale continuo a 40°C (mediante indumenti a circolazione di acqua calda) per 4-6 settimane. Non sono state dimostrate misure profilattiche efficaci. La vaccinazione con BCG sembra avere qualche effetto protettivo, ma la breve durata della protezione conferita richiederebbe ripetuti cicli vaccinali nelle popolazioni a rischio. L'educazione sanitaria riveste un'importanza centrale per la guarigione delle lesioni pre-ulcerative (2). Nella maggior parte dei paesi colpiti la malattia non viene considerata un problema prioritario di salute pubblica pertanto non si conosce né il numero dei casi né la distribuzione attuale. L'ulcera del Buruli è endemica in almeno 32 paesi della fascia tropicale e subtropicale (Africa, Asia sudorientale, America latina, Australia). Probabilmente i focolai, ora molto distanti e senza contatti tra loro, erano contigui prima che i continenti si separassero (120 milioni di anni or sono, nel periodo Giurassico). Seppur poco conosciuta e quasi mai mortale, l'ulcera del Buruli ha un pesante impatto sociale nelle popolazioni rurali delle zone interessate, in quanto altamente invalidante. Dal 1980 è considerata una malattia emergente in Africa occidentale, dove si è notato un notevole aumento di incidenza nelle aree in cui l'ambiente è stato notevolmente modificato dall'uomo (disboscamento, incremento delle aree agricole coltivate). Nella trasmissione dell'infezione sembrano essere coinvolti alcuni insetti nelle cui ghiandole salivari *M. ulcerans* sopravvive e si moltiplica (cimici d'acqua appartenenti al genere NAUCORIS e DIPLONYCHUS il cui ruolo è stato dimostrato nella trasmissione dell'infezione ai topi). Traumi e lesioni di continuità della cute (puntura da ago ipodermico, ferita da arma da fuoco, esplosione di mine anti-uomo) sono probabilmente la causa più frequente per la quale *M. ulcerans* supera la barriera cutanea nell'uomo (2, 5). Animali come il Koala e l'Opossum, in Australia, sono fre-

quentemente infettati. Non ci sono evidenze epidemiologiche sul contagio interumano.

Nel Febbraio del '98 l'OMS ha insediato una task force che si occupa del coordinamento delle istituzioni sanitarie e degli organismi impegnati nel combattere la piaga. Le strategie d'azione delineate, sono essenzialmente riconducibili, oltre ai programmi di educazione sanitaria e profilassi, alla ricerca di un valido metodo diagnostico e di un vaccino (2).

Obiettivo della nostra ricerca è stato quello di valutare le possibilità di isolamento in coltura primaria di *M. ulcerans*, a partire da campioni biotici effettuati in zone endemiche e trasportati nel nostro paese in condizioni non sempre ottimali.

*M. ulcerans*, simile per diversi aspetti a *M. tuberculosis* (lenta crescita, assenza di pigmento, formazione di cordoni), non è di facile isolamento date le sue condizioni di crescita legate alla concentrazione di bacilli presenti nel campione, alla temperatura (30-33°C), alla sensibilità nei confronti dei tradizionali metodi di decontaminazione e alla concentrazione di ossigeno, prediligendo la microaerofilia.

## MATERIALI E METODI

Nell'ambito di un intervento di volontariato effettuato presso l'ospedale La Croix (gestito dai padri Camilliani) a Zinvì, nel Benin, sono state esaminate 32 biopsie prelevate da ulcere localizzate in diverse parti del corpo e degli arti di adolescenti e giovani adulti. I pazienti rispondevano alla definizione clinica di caso secondo l'OMS e venivano sottoposti a biopsia in occasione dell'intervento chirurgico plastico. I campioni biotici sono pervenuti nel laboratorio dell'Unità Operativa di Micobatteriologia dell'Istituto d'Igiene dell'Università di Bari, dopo 10-15 gg dal prelievo, nell'intervallo di tempo che va da Marzo 2003 a Settembre 2004.

Per ciascun paziente sono pervenuti campioni biotici conservati sia in terreno di trasporto (7H9+PANTA) a temperatura ambiente, sia a secco ad una temperatura di 4°C (6, 7, 8).

Tutti i campioni sono stati sottoposti alle seguenti procedure per l'isolamento micobatterico:

- esame microscopico secondo Ziehl-Neelsen eseguito sia su campione biotico sia su centrifugato dopo decontaminazione;
- esame colturale previa decontaminazione sec. Kubica (9);
- semina in terreni liquidi (7H9 Bactec MGIT 960) e in terreni solidi (L-J + PACT, L-J +TCH, 7H11) con incubazione a 32°C (6).

Le colonie (di tipo rugoso e liscio, non cromogene a lenta crescita) isolate dopo 6-8 settimane dall'inoculo, sono state sottoposte a:

una batteria semplificata di prove biochimiche e

colturali tradizionali (tabella 3); le prove effettuate costituiscono solo una parte del pannello di test eseguiti abitualmente negli studi tassonomici (10).

INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2; il test permette di identificare 16 specie micobatteriche diverse, tra cui *M. ulcerans* (11). L'esecuzione del test prevede l'amplificazione della regione 16S-23S rRNA, del DNA estratto da coltura mediante PCR e ibridazione con specifiche sonde, immobilizzate in bande parallele, su una strip di nitrocellulosa. L'interpretazione delle bande, dopo aggiunta di cromogeno, permette, seguendo un pannello di lettura, l'identificazione delle colonie in esame. Nel test INNO-LiPA, *M. ulcerans* e *M. marinum*, reagiscono alla stessa sonda oligonucleotidica e quindi presentano la stessa banda colorata; il *M. marinum* è, però, facilmente distinguibile in coltura, perché fotocromogeno e con caratteristiche biochimiche e colturali diverse (12).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC); l'analisi degli acidi micolici della parete, mediante HPLC, è stata eseguita previa saponificazione con potassa alcolica, estrazione con cloroformio e derivatizzazione a bromo-fenacil esteri (13). La separazione è stata eseguita su un apparecchio System Gold modello 126, utilizzando una colonna C<sub>18</sub> Ultrasphere XL (Beckman), in presenza di un gradiente di metanolo e cloruro di metilene. L'interpretazione del cromatogramma è stata ottenuta mediante sovrapposizione con l'unico profilo di *M. ulcerans* rintracciato in letteratura (14).

## RISULTATI

Nel presente lavoro sono stati complessivamente esaminati 64 campioni (un campione in terreno di trasporto ed uno a secco per ciascun paziente) (figura I) appartenenti a 32 pazienti le cui caratteristiche sono descritte nella tabella 1.

Possiamo affermare con certezza, come dimostrano i risultati riportati nella tabella 2, che i campioni conservati in terreno di trasporto hanno dato migliori risultati diagnostici.

Dei 18 preparati con microscopia positiva soltanto due campioni non hanno mostrato sviluppo in coltura, probabilmente per l'elevata sensibilità del micobatterio ai tradizionali metodi di decontaminazione.

È stato possibile isolare in coltura (figura II) ed identificare *M. ulcerans* in campioni appartenenti a 19 dei 32 pazienti studiati (tabella 1).

I risultati delle prove biochimiche e colturali sono illustrate nella tabella 3.

Il test INNO-LiPA ha presentato positività per *M. ulcerans*/*M. marinum* per tutti i 19 isolati.

L'identificazione del *M. ulcerans* è stata confermata mediante l'analisi dei lipidi della parete in HPLC (figura III).

L'elevata prevalenza di isolamenti ottenuta, (59.3%), dimostra che i campioni clinici pervenuti alla nostra osservazione erano, sicuramente idonei, nonostante i tempi di attesa prima dell'inoculo in coltura.

Data l'elevata presenza, nei campioni biotici, di flora batterica concomitante, l'inoculo in terreni selettivi è consigliabile anche dopo la decontaminazione. Si è visto che il numero dei bacilli presenti nell'inoculo è determinante per lo sviluppo di colonie in coltura primaria. Queste ultime hanno mostrato tempi di crescita sovrapponibili sia in terreno solido che in terreno liquido. Lo sviluppo di colonie nei terreni sintetici, quali 7H11, con incubazione in CO<sub>2</sub>, si è mostrato rigoglioso ma non costante, probabilmente per la mancanza di selettività del terreno suddetto.

Nel nostro studio, si è visto come le indagini fenotipiche tradizionali abbinata ad alcune prove di biologia molecolare e all'analisi dei lipidi della parete (HPLC), siano state fondamentali nella corretta identificazione di un micobatterio poco conosciuto come *M. ulcerans*.

## DISCUSSIONE

Le possibilità di intervento clinico sulla complessa problematica dell'ulcera del Buruli, patologia per la quale non è ancora disponibile un vaccino efficace, né una terapia medica, sono attualmente basate su una diagnosi precoce associata alla terapia chirurgica.

La diagnostica micobatterica è ormai diventata un grosso capitolo della microbiologia. Le specie micobatteriche conosciute sono numerose e in via di espansione, ma è pur vero che vi è scarsità di letteratura scientifica e di ricerca sul *M. ulcerans*. Alla luce dell'importanza di una diagnosi precoce per un trattamento efficace, il laboratorio di micobatteriologia può essere di ausilio sia mediante una diagnostica tradizionale (microscopia, coltura, identificazione), sia con una diagnostica rapida. Quest'ultima può essere eseguita:

- su campioni clinici, mediante test di PCR non commerciali (IS2404, IS2606),
- su colonie mediante l'uso di sonde genetiche (INNO-LiPA) o HPLC. Metodologie di DNA fingerprinting (RFLP, DNA sequencing, Ribotyping, PFGE, AFLP) possono differenziare genotipicamente i ceppi di *M. ulcerans* presenti nei diversi Paesi (2, 6, 15).

A differenza della tubercolosi, in cui non è possibile dare validità diagnostica ai test sierologici data la loro scarsa specificità e sensibilità, nell'ul-

cera del Buruli si è visto che i pazienti generano una risposta umorale specifica che non ha reazione crociata con la CF protein di *M. tuberculosis*, suggerendo la potenziale importanza di questo tipo di risposta specifica per *M. ulcerans*, nelle zone in cui la tubercolosi è endemica (2).

Anche per questo micobatterio come per altri micobatteri non tubercolari è possibile eseguire test cutanei. Con il progredire della malattia dalle fasi iniziali a quelle ulcerative, si osserva una progressiva positivizzazione del test cutaneo con burulina, derivato antigenico del *M. ulcerans* (2). La diagnosi di ulcera del Buruli, data l'estrema

povertà di organizzazione e risorse dei paesi colpiti, è attualmente prevalentemente clinica; inoltre non sempre è immediata, a causa delle numerose altre malattie ulcerative cutanee presenti nelle aree tropicali (actinomicosi, leishmaniosi, lebbra, ecc...).

Nel nostro lavoro abbiamo potuto dimostrare che una efficace diagnosi eziologica di infezione da *M. ulcerans* può essere agevolmente effettuata anche con metodologie tradizionali di diagnostica micobatterologica eseguibili sia a distanza che in loco.

**Tabella I.** Caratteristiche casistica esaminata

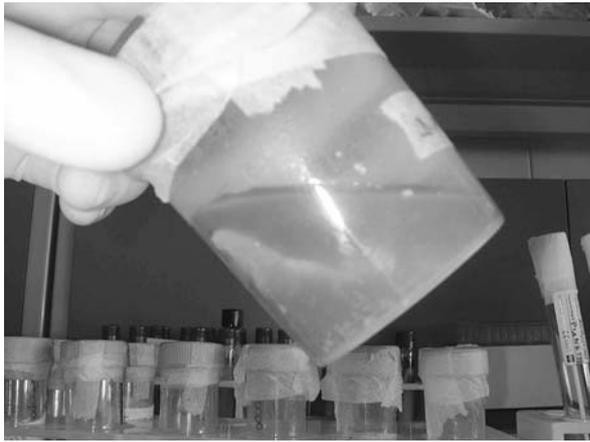
PAZIENTE	DIAGNOSI CLINICA	ETÀ	MICR.	COLT.	IDENTIFICAZIONE
1	Ulcera polso mano destra	6	+	+	<i>M. ulcerans</i>
2	Ulcera malleolo e tendine di Achille piede destro	11	+	+	<i>M. ulcerans</i>
3	Ulcera circolare coscia dex sottominata gluteo omolaterale	18	-	-	
4	Ulcera gomito destro recidiva già trattato con trapianto cute a rete	7	-	+	<i>M. ulcerans</i>
5	Infiltrato nodulare (papula) su gluteo sinistro	2	-	-	
6	Infiltrato nodulare (pustola) su gluteo sinistro	3	-	-	
7	Ulcera arto superiore sinistro in forma edematosa già decorticata dal braccio all'ascella	26	+	-	
8	Ulcera gomito destro	7	-	+	<i>M. ulcerans</i>
9	Ulcera fondo comprendente tessuto fibroso su gravissime retrazioni dorso piede destro	28	-	-	
10	Placca in via di ulcerazione su emitorace sinistro ed addome	14	+	+	<i>M. ulcerans</i>
11	Ulcera iniziale su addome sinistro	5	+	+	<i>M. ulcerans</i>
12	Recidiva ulcera del Buruli su dorso piede, ginocchio e coscia destra	25	-	-	
13	Ulcera regione dorso lombare e glutei già sottoposto ad escarectomia	7	-	+	<i>M. ulcerans</i>
14	Sospetta ulcera del Buruli su coscia destra	19	+	+	<i>M. ulcerans</i>
15	Tetano + ulcera avambraccio sin	23	+	+	<i>M. ulcerans</i>
16	Ulcera braccio dex	60	+	+	<i>M. ulcerans</i>
17	Ulcera gomito sin	20	+	+	<i>M. ulcerans</i>
18	Ulcera braccio sin	8	+	+	<i>M. ulcerans</i>
19	Ulcera braccio dex	14	+	+	<i>M. ulcerans</i>
20	Erisipela coscia sin	45	-	-	
21	Sospetto meningioma	12	-	-	
22	Gangrena gamba dex	23	-	-	
23	Flemmone dorso piede sin	65	+	+	<i>M. ulcerans</i>
24	Ulcera braccio dex	5	-	-	
25	Neoformazione palmo mano dex	40	-	-	
26	Ulcera gomito sin	11	-	-	
27	Ulcera polso dex	20	+	+	<i>M. ulcerans</i>
28	Ulcera ginocchio sin	3	+	-	
29	Ulcera malleolo e piede dex	6	+	+	<i>M. ulcerans</i>
30	Ulcera coscia sin	30	+	+	<i>M. ulcerans</i>
31	Placca coscia dex	56	+	+	<i>M. ulcerans</i>
32	Ulcera piede dex	5	+	+	<i>M. ulcerans</i>

**Tabella 2.** Esami batterioscopici e colturali dei diversi campioni

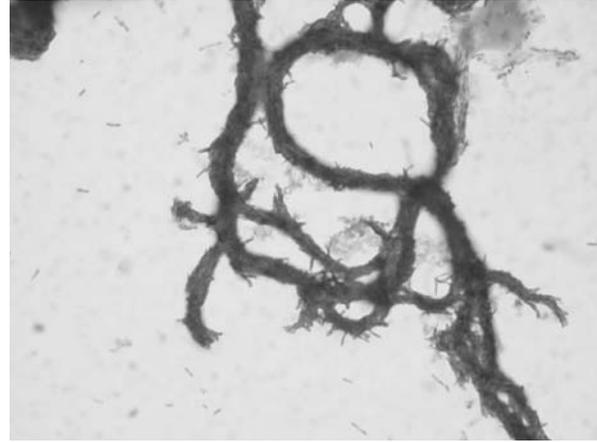
	CAMPIONE IN TERRENO DI TRASPORTO	CAMPIONE A SECCO
batterioscopico - colturale -	11	17
batterioscopico+ colturale -	2	2
batterioscopico - colturale +	3	1
Batterioscopico + colturale +	16	12

**Tabella 3.** Risultati dei test biochimici e colturali effettuati sugli isolati

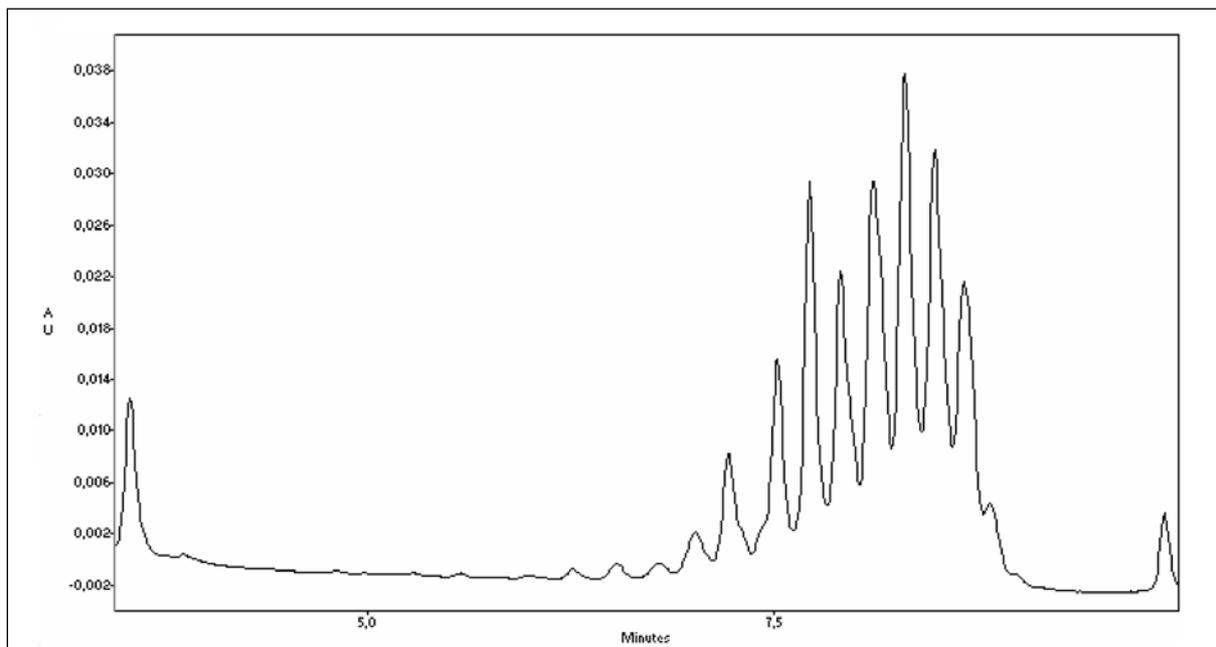
TEST	POSITIVI	NEGATIVI
Niacina	0	19
Riduzione nitrati	0	19
Catalasi 68°C	19	0
Idrolisi Tween 80	0	19
Ureasi	0	19
Sviluppo in TCH	19	0
Sviluppo su LJ-NaCl 5%	0	19
Sviluppo a 32°C	19	0
Sviluppo a 37°C (1° isolamento)	9	10
Sviluppo a 45°C	0	19



**Figura I.** Campioni biotici conservati in terreno di trasporto (7H9 + PANTA)



**Figura II.** Aspetto microscopico di *M. ulcerans* da coltura



**Figura III.** Profilo in HPLC di *M. ulcerans*

## BIBLIOGRAFIA

1. Aguiar J, Stenou C. Les ulcères de Buruli en zone rurale au Bénin: pris en charge de 635 cas. *Medecine Tropicale*, 1997; 57: 83-90.
2. Asiedu K, Scherpbier R, Raviglione M. BURULI ULCER. *Mycobacterium ulcerans* infection. WHO/GBUI/2000.1
3. George KM, Barker LP, Welty DM, Small PL. Partial purification and characterization of biological effects of a lipid toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. *Infection and Immunity* 1998; 66: 587-93.
4. Portaels F, Traore H, De Ridder K, Meyers WM. In vitro susceptibility of *Mycobacterium ulcerans* to clarithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42: 2070-3.
5. Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 1999; 353: 986.
6. Portaels F, Johnson P, Meyers WM. Buruli ulcer: Diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. Geneva: World Health Organization; 2001.
7. Bar W, Rusch-Gerdes S, Richter E, et al. *Mycobacterium ulcerans* infection in a child from Angola: diagnosis by direct detection and culture. *Trop Med Int Health* 1998 Mar; 3(3): 189-96.
8. Mve-Obiang A, Remacle J, Palomino JC, Houbion A, Portaels F. Growth and cytotoxic activity by *Mycobacterium ulcerans* in protein-free media. *FEMS Microbiol Lett* 1999 Dec 1; 181(1): 153-7.
9. Palomino JC, Portaels F. Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC system. *J Clin Microbiol* 1998 Feb; 36(2): 402-8.
10. Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 1992 Apr; 42(2): 315-23.
11. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 2003 Sep; 41(9): 4418-20.
12. Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, et al. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and genotype *Mycobacterium* assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with Mycobacterial strains. *J Clin Microbiol* 2004 Jul; 42(7): 3083-8.
13. Tortoli E, Bartoloni A. High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria. *Rev Med Microbiol* 1996; 7: 207-19.
14. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 704-26.
15. Stinear T, Ross BC, Davies JK, et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1018-23

**Danila Costa**

U.O. Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica  
 Azienda Ospedaliera Policlinico di Bari  
 Tel 080 5593300 - Fax 080 5478472  
 e-mail: [costad7@libero.it](mailto:costad7@libero.it)