

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MYCOBACTERIES DE L'ENVIRONNEMENT AU BAS-ZAIRE

par

F. PORTAELS

Unité de Parasitologie de l'I. M. T.
Université Nationale du Zaïre

B. P. 747, Kinshasa XI, République du Zaïre

Résumé — 332 échantillons ont été prélevés dans diverses régions du Bas-Zaïre; 155 ont donné des cultures positives; 153 mycobactéries et 5 Nocardias ont été isolées. Ces mycobactéries appartiennent aux groupes II, III et IV de Runyon. Aucune mycobactérie du groupe I n'a été isolée. Un pourcentage non négligeable (21 p. cent) de souches à pigment rose a été isolé.

Parmi les mycobactéries potentiellement pathogènes on trouve 13 *M. avium-intracellulare*, 17 *M. scrofulaceum*, 24 *M. ranae* (sérotypage peregrinum), 2 *M. chelonae*, 1 *M. marinum* (scotochromogène) et 1 souche voisine de *M. ulcerans*. Aucune différence notable n'a été signalée entre les différents biotopes étudiés ni entre les types d'échantillons étudiés.

I. INTRODUCTION

L'intérêt de l'étude des mycobactéries de l'environnement est lié au fait que, dans certaines conditions, ces mycobactéries peuvent passer de l'état saprophytique à l'état pathogène. (*M. ranae*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*).

Le présent travail tend à rechercher et étudier les mycobactéries de l'environnement au Bas-Zaïre et plus spécialement dans les régions où de nombreux cas d'ulcères à *M. ulcerans* ont été observés.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Origine des prélèvements

332 échantillons ont été prélevés dans diverses régions du Bas-Zaïre :

- a) Région de Kinshasa et ses environs proches.
- b) Plantations de canne à sucre de Kwilu-Ngongo (ex Moerbeke).
- c) Forêt du Mayumbe.
- d) Territoire de Songololo, au sud de la route Kinshasa-Matadi, près de la frontière angolaise.
- e) Territoire de Songololo, au nord de la route Kinshasa-Matadi, entre les rivières Kwilu et Lufu. La majorité des prélèvements ont été faits dans cette région car de nombreux cas d'ulcères à *M. ulcerans* y ont été observés. (W. M. Meyers, communication verbale).

Remarquons que le Bas-Zaïre est une région très peuplée et qu'il est assez difficile de prélever des échantillons en des endroits peu fréquentés.

2. Nature des prélèvements

Des échantillons d'eau, de boue, des poissons et des sangsues ont été prélevés dans des rivières, lacs, marais et caniveaux.

Des échantillons de terre, de plantes et des fourmis ont été prélevés aux endroits proches et éloignés de ces points d'eau. Les échantillons d'eau ont été prélevés en bordure des berges, de préférence dans les endroits les moins fréquentés, afin d'éviter les éventuelles contaminations humaines.

Tous les échantillons ont été récoltés dans des récipients stériles.

3. Traitement des échantillons et méthodes de décontaminations

- a) *Eau* : On centrifuge 50 ml d'eau pendant 10 minutes à 3000 t.p.m. On resuspend le culot dans 10 ml d'eau distillée.
- b) *Boue et terre* : On ajoute 10 ml d'eau distillée à 20 g d'échantillon. On agite vigoureusement puis on laisse décanter. On prélève ensuite le liquide surnageant.
- c) *Plantes, fourmis et sangsues* : L'échantillon est placé dans un mortier et coupé en petits morceaux. On ajoute du sable stérile et 10 ml d'eau distillée. On broie ensuite l'échantillon. Le liquide surnageant est recueilli.
- d) *Poissons* : les intestins et les branchies sont prélevés stérilement et traités séparément dans un mortier comme précédemment.

Deux méthodes de décontamination ont été essentiellement utilisées :

- a) La méthode au phosphate trisodique (Corper et Stoner, 1946).
- b) La méthode à l'acide oxalique de Beerwerth (Beerwerth et Schurmann, 1969).

Nous avons également, au début de nos recherches, utilisé la méthode à l'NaOH (4 p. cent) et la méthode de Kubica (Kubica *et al.*, 1963) mais nous nous sommes ensuite limités aux deux méthodes qui suivent.

a) Méthode au phosphate trisodique

On ajoute à 5 ml d'échantillon traité, 10 ml d'une solution à 10 p. cent de Na_3PO_4 .

On laisse agir la température ambiante pendant 24 heures. On centrifuge la solution pendant 15 à 20 minutes à 3000 t.p.m.

Le culot est resuspendu dans un peu d'eau distillée etensemencé sur 4 tubes de Löwenstein-Jensen.

b) Méthode de Beerwerth

On ajoute à 5 ml d'échantillon traité 10 ml de NaOH à 4 p. cent.

On laisse agir à température ambiante pendant 20 minutes.

On centrifuge la solution pendant 15 à 20 minutes à 3000 t.p.m.

On ajoute au sédiment 10 ml d'acide oxalique à 5 p. cent.

On laisse agir à température ambiante pendant 20 minutes.
On centrifuge pendant 15 à 20 minutes à 3000 t.p.m.
Le culot est resuspendu dans un peu d'eau distillée et ensemencé sur 4 tubes de Löwenstein-Jensen.

4. Culture des échantillons et identification des mycobactéries

Pour chaque méthode de décontamination, 4 tubes de Löwenstein sont ensemencés; 2 d'entre eux sont incubés à 28° et 2 à 37°.

Les tubes sont examinés chaque semaine et conservés pendant un an.
Les colonies suspectées d'être des mycobactéries sont colorées au Ziehl, puis repiquées sur Löwenstein.

Lorsque le repiquage est positif, la souche est ensemencée sur milieu de Dubos oleic acid agar en boîte de Petri afin de s'assurer de la pureté de la souche isolée, de connaître la morphologie de la colonie et de pouvoir éventuellement réisoler sur Löwenstein les types différents de colonies lorsque le repiquage contient plusieurs mycobactéries d'espèces différentes. Les mycobactéries isolées sont identifiées suivant le schéma appliqué dans notre laboratoire (Pattyn et Portaels, 1972). Le test à la putrescine (Bonicke et Nolte, 1967) permettant de différencier les mycobactéries à croissance rapide des mycobactéries à croissance lente, a été ajouté à ce schéma.

III. RESULTATS

Sur 332 échantillons examinés, 155 donnent des cultures positives.

Certains échantillons positifs renferment plusieurs mycobactéries différentes. D'autres sont, en réalité, de faux positifs car sont le résultat d'une contamination au cours des manipulations en laboratoire.

Les 155 échantillons positifs renferment 158 mycobactéries différentes après exclusion de ces contaminants de laboratoire.

1. Mycobactéries isolées

a) Mycobactéries à croissance rapide

34 rapid growers ont été isolées, se répartissant de la façon suivante :

1) *M. ranae* : 24 souches.

Ces souches produisent sur corn meal agar des colonies Sm f ou Rf (Pattyn, 1970); elles acidifient toutes le fructose et le mannitol et utilisent le citrate; de plus, elles sont agglutinées par le sérum spécifique anti-peregrinum. Elles peuvent donc être considérées comme des *M. ranae*, sérotype *peregrinum*.

2) Rapid growers autres que *M. ranae* : 10 souches (voir tableau 1).

— 3 souches scotochromogènes oranges ont été isolées; elles ont les mêmes caractéristiques que *M. ranae* mais ne sont agglutinées par aucun sérum anti-rapid grower.

On les considère comme des *M. ranae* scotochromogènes.

TABLEAU 1

N°	Pigment	Dubos	Corn Meal Agar	Mac Conkey	33°	37°	42°	44,5°	NaCl 5 %	Fructose	Sucrose	Mannitol	Citrate	Nitrate	Phosphatase	Pepton agar	Citrate de Fe	Putrescine	Agglutination	Identification
10	scoto orange	Sm Gy	Sm Gy	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+		<i>M. ranae?</i> scoto
13	scoto orange	Sm Gy	Sm Gy	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+		<i>M. ranae?</i> scoto
32	scoto orange	Sm Gy	Sm Gy	+	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+		<i>M. ranae?</i> scoto
6	—	R	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+		<i>M. chelonei</i>
16	—	Sm Sa	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+		<i>M. chelonei</i>
3	scoto jaune	Ry	Ry	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	<i>M. marinum</i> scoto
156	scoto orange	Sm Gy	Sm Gy	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+		<i>M. vaccae</i> scoto
84	—	Sm G	Sm G	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+		<i>M. diernhoferi</i>
135	—	R cordes	R	—	+	+	—	—	—	+	+	—	+	—	+	+	+	+	—	

— 2 souches sont identifiées comme *M. chelonae*; ces souches n'acidifient pas le fructose, le sucrose et le mannitol et n'utilisent pas le citrate; le test à la putrescine est positif et elles poussent sur pepton agar; elles ne poussent pas sur Löwenstein renfermant 5 p. cent de NaCl ni sur Mac Conkey; elles ne sont agglutinées par aucun sérum anti-rapid grower.

— *M. marinum* *scotochromogène*. Cette souche pousse en quelques jours à 33°, mais pousse très mal à 37° (après plus d'un mois); sur Dubos et sur corn meal agar, la colonie est rough. Cette souche, mis à part le fait qu'elle soit *scotochromogène* au lieu de *photochromogène*, possède les caractères culturels, biochimiques et enzymatiques de *M. marinum*.

— *M. vaccae* *scotochromogène*. Cette souche est *scotochromogène* et orange. Elle utilise le fructose, le sucrose et le mannitol; elle acidifie le citrate. Mis à part le fait qu'elle soit *scotochromogène* au lieu de *photochromogène*, on peut la considérer comme étant une *M. vaccae*.

— *M. diernhoferi*. Cette souche utilise le fructose et le mannitol mais n'acidifie pas le citrate. La colonie sur Dubos et sur CMA est Sm G.

— La souche 135 (voir tableau 1) pousse sur Löwenstein en un jour; la colonie est rough sur Dubos et sur corn meal agar avec des « cordes » sur Dubos; cette souche ne pousse pas à 42°, acidifie le sucrose mais pas le mannitol; elle ne possède donc pas les caractères de *M. phlei* ni de *M. smegmatis* bien que la colonie soit rough; l'identification de cette souche reste en suspens.

— 1 seule souche à croissance rapide, récemment isolée n'a pas encore été étudiée.

b) *Mycobactéries à croissance lente*

75 slow growers ont été isolées.

1) *M. avium-intracellulare* : 13 souches.

Les souches produisent sur Dubos des colonies Sm T ou Sm S; certaines poussent à 42° d'autres pas. Les autres tests réalisés confirment leur appartenance au groupe *avium-intracellulare*.

Les tests d'agglutination n'ont pas été réalisés, il n'est donc pas possible de faire la distinction entre *M. avium* et *M. intracellulare*.

2) *M. scotochromogènes* : 30 souches.

40 p. cent des slow growers isolées sont des *scotochromogènes*. Ces souches produisent sur Dubos des colonies Sm Sy, Sm Ky, Sm Gy et RKy. Elles peuvent se diviser en 3 groupes d'après les résultats de la phosphatase (Pase) et de la nitratase (Nitr.) (voir tableau 2).

TABLEAU 2

	Nombre de souches	Identification
Pase : + Nitr. : +	2	<i>M. flavescens</i>
Pase : + Nitr. : —	11	<i>M. gordonae</i> ou <i>M. spec.</i> « 2 »
Pase : — Nitr. : —	17	<i>M. scrofulaceum</i>

Les tests d'agglutination et les amidases n'ont pas été réalisés.

3) *M. terrae* : 8 souches.

Ces souches produisent sur Dubos des colonies SmKt ou RK; elles sont phosphatase positives et nitratase négatives.

4) *M. nonchromogenicum* : 12 souches.

Ces souches produisent sur Dubos, comme *M. terrae*, des colonies SmKt ou RK; elles sont positives pour la phosphatase et pour la nitratase.

5) 5 mycobactéries se rapprochent du groupe terrae-nonchromogenicum par la morphologie de la colonie sur Dubos, l'absence de croissance à 42° et 44,5°, la résistance à l'INH 1 γ et 5 γ et la présence d'une catalase élevée et positive après chauffage pendant 20 minutes à 68°. Ces mycobactéries diffèrent du groupe terrae-nonchromogenicum par la phosphatase négative et la nitratase négative.

6) 1 mycobactérie non chromogène pousse après 15 jours d'incubation à 33° et ne pousse pas à 37°. Elle produit sur Dubos des colonies rough. Les tests de la phosphatase, la nitratase et la putrescine sont négatifs. Cette souche se rapproche fortement, par ces caractères, de *M. ulcerans*. D'autres tests d'identification n'ont pas encore été exécutés.

7) 6 mycobactéries à croissance lente et non chromogènes ont été isolées récemment et ne sont pas encore identifiées.

c) *Mycobactéries à pigment rose* (tableau 3).

TABLEAU 3
SOUCHES ROSES

Echant.	N°	col Dubos	Col GMA	Mec	33°	37°	42°	44,5°	NaCl	Fr	Suc	Mtol	Citr.	Nitr.	Pase	P.A.	FeNH ₄	Putr.
plante	15	Sm K	stiks	—	+	+			—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	39	R F	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
eau	44	R F	stiks	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	47	R F	stiks		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	51	R F	stiks	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	58	R F	—		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
plante	62	R F	—		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	67	R F	stiks		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
plante	75	R K	—		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
boue	136	R K f	R K		+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
eau	167	R K			+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—

31 mycobactéries à pigment rose ont été isolées. Elles sont toutes légèrement photochromogènes et poussent sur Löwenstein en 3 jours à 37°.

Ces souches produisent sur Dubos des colonies Sm K, RK, RF et Rf. Aucune d'entre elles ne pousse sur Mac Conkey (McC). La phosphatase (Pase) est fortement positive dans tous les cas. Le test à la putrescine

(Putr.) est négatif et aucune souche ne pousse sur pepton agar (P. A.). La réduction du citrate de fer ammoniacal (Fe NH₄) est également négative. Vu la croissance très rapide de ces mycobactéries sur Löwenstein, nous avons étudié 11 souches en suivant le schéma utilisé dans notre laboratoire pour les rapid growers (voir tableau 3). On constate que ces mycobactéries ne poussent pas à 42° et 44,5°, ni sur Löwenstein renfermant 5 % de NaCl. Elles n'acidifient pas le fructose (Fr), le sucrose (Sucr.) et le mannitol (Mtol) et n'utilisent pas le citrate (Citr.). Certaines souches ne poussent pas sur corn meal agar (CMA) d'autres y poussent très mal en formant des stiks; une seule souche forme sur CMA des colonies RK. La nitratase (Nitr.) est négative pour toutes les souches étudiées à l'exception d'une seule.

d) *Nocardia*

5 souches ont été reconnues comme appartenant au genre *Nocardia* en se basant uniquement sur la morphologie de la colonie sur Dubos.

Ces souches poussent sur Dubos en moins de 5 jours et donnent de grandes colonies formées de nombreuses hyphes aériennes.

e) *Souches non identifiées*

13 souches isolées récemment ne sont pas encore étudiées.

2. Nature du prélèvement et mycobactéries isolées (tableau 4)

Les 7 types différents d'échantillons ont tous permis l'isolement de mycobactéries.

Le tableau 4 indique la répartition de ces mycobactéries en fonction de la nature de l'échantillon.

TABLEAU 4

	nombre d'échantillons	nombre d'échantillons positifs	rapid growers		slow growers										nombre de souches isolées
			<i>M. ranae</i>	autres R.G.	scotochromogènes	<i>M. avium</i> -intracellulare	<i>M. terrae</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	M. groupe III	<i>M. ulcerans</i> ?	S.G. ?	<i>M. roses</i>	<i>Nocardia</i>	M. ?	
eau	102	52	2	1	7	3	4	6	1	0	4	13	0	7	48
terre	61	23	6	0	5	2	2	2	0	0	0	2	1	2	22
boue	66	44	13	5	7	5	1	2	3	0	1	11	2	3	53
plantes	67	25	2	4	7	2	0	2	1	1	1	4	2	0	26
fourmis	14	4	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
sangues	5	3	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
poissons	17	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3

Signalons pour les rapid growers que les 2 *M. chelonai* proviennent d'une plante et de boue, que 1 *M. ranae* scotochromogène provient d'un échantillon d'eau et les 2 autres de plante, que *M. diernhoferi* et *M. vaccae* proviennent de boue et que la souche rough poussant en 1 jour provient également de boue. La souche *M. marinum* a été isolée d'une plante.

3. Mycobactéries isolées dans les différentes régions étudiées (tableau 5)

Le tableau 5 nous indique la répartition des mycobactéries isolées dans les diverses régions envisagées.

TABLEAU 5

	nombre d'échantillons	nombre d'échant. pos.	rapid growers		slow growers										Nombre de souches isolées
			<i>M. ranae</i>	autres R.G.	Scotochromogènes	<i>M. avium</i> -intrac.	<i>M. terrae</i>	<i>M. nonchromogen.</i>	M. groupe III	<i>M. ulcerans</i> ?	S. G. ?	<i>M. roses</i>	Nocardia	M. ?	
Kinshasa	32	17	0	1	1	2	0	3	0	0	1	4	1	2	15
Kwilu-Ngongo	30	15	1	1	5	2	0	3	0	0	2	3	0	2	19
Mayumbe	11	6	0	0	2	2	0	0	0	0	0	3	0	1	8
Songololo (1)	217	89	16	8	21	6	6	4	5	1	2	15	2	7	93
Songololo (2)	42	28	7	0	1	1	2	2	0	0	1	6	2	1	23

(1) Territoire de Songololo situé au nord de la route Kinshasa-Matadi.

(2) Territoire de Songololo situé au sud de la route Kinshasa-Matadi.

Remarquons que les 2 souches de *M. chelonai*, souche *M. marinum* et la souche voisine de *M. ulcerans* ont été isolées dans le territoire de Songololo, au nord de la route Kinshasa-Matadi, région où de nombreux cas d'ulcères à *M. ulcerans* ont été observés.

4. Température d'incubation et mycobactéries isolées.

Les échantillons ont été incubés en partie à 28° et en partie à 37°. 56 souches ont été isolées en primoculture à 28° et 71 souches à 37°. Pour 12 échantillons, une même espèce mycobactérienne a été isolée à 28° et à 37°. (6 *M. ranae*, 3 scotochromogènes, 1 *M. terrae* et 1 *M.* non déterminée). Dans les autres cas, les mycobactéries ont été isolées soit à 28° soit à 37°.

Nombre de souches isolées à 28° et à 37° (tableaux 6, 7 et 8).

TABLEAU 6

a) Rapid growers	28°	37°	28° et 37°
<i>M. ranae</i>	10	8	6
<i>M. ranae</i> scoto	2	1	
<i>M. vaccae</i> scoto		1	
<i>M. diernhoferi</i>	1		
<i>M. rough</i>		1	
<i>M. marinum</i> scoto	1		
<i>M. chelonae</i>	1	1	

TABLEAU 7

b) Slow growers	28°	37°	28° et 37°
Scotochromogènes	12	14	4
<i>M. avium</i> -intracellulare	6	7	
<i>M. terrae</i>	4	3	1
<i>M. nonchromogenicum</i>	7	5	
M. groupe III	1	4	
<i>M. ulcerans</i>	1		

TABLEAU 8

	28°	37°	28° et 37°
c) <i>M. roses</i>	10	21	
d) <i>Nocardia</i>	1	4	

5. Temps d'incubation et mycobactéries isolées (tableau 9 et figure 1)

Les échantillons négatifs ont été conservés pendant 1 an afin d'augmenter nos chances d'isoler des mycobactéries à croissance lente.

L'isolement de mycobactéries s'échelonne entre 4 jours et 18 semaines d'incubation, avec un maximum d'isolement entre 1 et 4 semaines d'incubation (voir figure 1). Nous avons représenté séparément sur cette figure les souches isolées à 28° et celles isolées à 37°.

Nombre de souches isolées

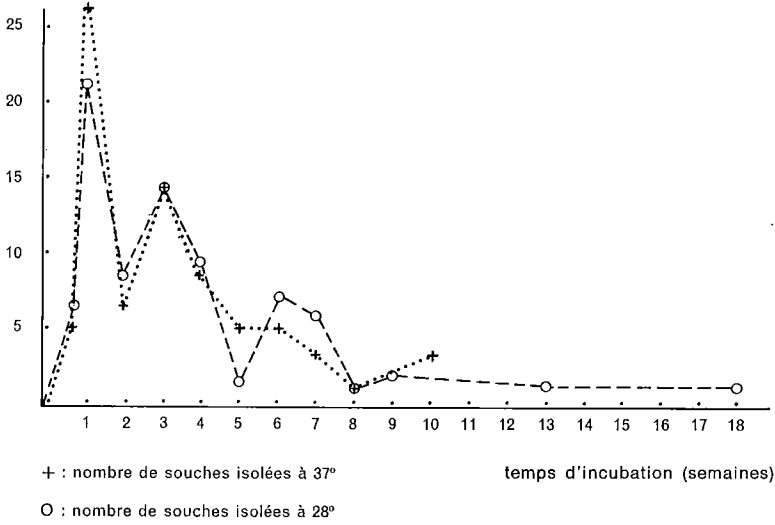


Figure 1

Le tableau 9 indique le nombre de souches isolées en fonction du temps d'incubation.

TABLEAU 9

	Temps d'incubation en semaines												
	< 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	18
<i>M. ranae</i>	9	10	2	1	1					1			
Autres R.G.	1	4	2	3									
Scotochromogènes		2	4	5	9	3	2	3	1		1		
<i>M. avium</i> -intracell.			1	3		2	2	3		1	1		
<i>M. terrae</i>		2	1	1	2			1	1				
<i>M. nonchromogenicum</i>		2	4	5	1								
M. groupe III		1	1	1		1				1			
<i>M. ulcerans</i> ?					1								
S.G. ?		1					1			1		3	
<i>M. roses</i>	2	16	3	7	1	2							
Nocardia	2	2			1								
M ?	2			3	2		2	2				1	1

a) *Mycobactéries à croissance rapide*

Toutes les souches ont été isolées entre 4 jours et 4 semaines d'incubation. Notons que 1 souche de *M. chelonae* a été isolée après 1 semaine d'incubation, l'autre après 3 semaines. *M. marinum* a été isolé après 3 semaines d'incubation.

b) *Mycobactéries à croissance lente.*

L'isolement des souches à croissance lente s'échelonne entre 1 et 18 semaines d'incubation.

Notons que la souche *M. avium-intracellulare* et la souche scotochromogène (*M. scrofulaceum*) isolées après 10 semaines d'incubation proviennent de tubes incubés à 37° et que les 2 souches non encore déterminées isolées après 13 et 18 semaines d'incubation proviennent de tubes incubés à 28°. La souche semblable à *M. ulcerans* provient d'un tube incubé à 28° pendant 4 semaines.

6. *Méthodes de décontamination* (tableaux 10 et 11).

Nous avons employé plusieurs méthodes de décontamination dans le but d'augmenter nos chances d'isolement de mycobactéries.

L'efficacité des méthodes de décontamination employées est résumée dans le tableau 10.

TABLEAU 10

Méthodes	Nombre total de tubes	Tubes contaminés	Tubes négatifs	Tubes positifs	Mycobactéries isolées
NaOH 4 %	104	84 (80,8 %)	13 (12,5 %)	7 (6,7 %)	7
Kubica	103	57 (55,5 %)	39 (38 %)	7 (6,5 %)	7
Na ₃ PO ₄ 10 %	1111	703 (63,2 %)	288 (26 %)	120 (10,8 %)	47
Beerwerth	948	377 (39,7 %)	351 (37 %)	220 (23,2 %)	99

L'effet des différentes méthodes de décontamination sur les mycobactéries isolées est résumé dans le tableau 11.

TABLEAU 11

	Nombre de mycobactéries isolées					
	Total	Rapid growers	Slow growers	Souches roses	Nocardia	Souches indéterminées
NaOH	7	1	4	1	1	
Kubica	7	1	4		1	1
Na ₃ PO ₄	47	20 (42,5 %)	15 (31,9 %)	7	2	3
Beerwerth	99	15 (15,1 %)	52 (52,5 %)	23	1	9

44,5 p. cent des échantillons renferment des mycobactéries.

Il nous paraît utile de signaler quelques points importants concernant l'isolement de ces mycobactéries et leur identification.

1) Isolement des mycobactéries

a) Temps d'incubation (figure 1 et tableau 9)

Rappelons que nous avons incubé nos tubes pendant un an afin d'augmenter nos chances d'isoler certaines mycobactéries à croissance lente et en particulier *M. ulcerans*. Cela nous a permis d'isoler 3 souches après 10 semaines d'incubation (dont 1 *M. avium-intracellulare* et 1 *M. scrofulaceum*), 1 souche après 3 mois et 1 souche après 4 mois d'incubation (non encore identifiées car isolées trop récemment).

b) Températures d'incubation

Les tableaux 6, 7 et 8 nous montrent que le fait d'avoir incubé les tubes à deux températures différentes nous a permis d'isoler environ deux fois plus de mycobactéries que si nous nous étions limités à une seule température. Déjà antérieurement (Pattyn *et al.*, 1971) l'incubation à 28° nous a permis d'isoler un plus grand nombre de mycobactéries bien que les repiquages de ces souches poussaient bien à 37°. De plus, l'incubation à 28° nous donne la possibilité d'isoler éventuellement des germes thermophobes tels que *M. ulcerans* et *M. marinum*. Rappelons ici que dans notre travail, la souche *M. marinum* et celle voisine de *M. ulcerans* ont toutes deux été isolées à 28°.

c) Méthodes de décontamination

La méthode de Beerwerth est la meilleure car elle donne un moins grand nombre de tubes contaminés (39,7 p. cent) et un plus grand nombre de tubes négatifs (37 p. cent) et de tubes positifs (23,2 p. cent) que les autres méthodes (tableau 10).

La méthode de Beerwerth permet l'isolement d'un plus grand nombre de slow growers (52,5 p. cent) que la méthode au phosphate trisodique (31,9 p. cent) (tableau 11).

Nous nous sommes donc limités à ces deux dernières méthodes afin d'augmenter au maximum nos chances d'isolement de rapid growers et de slow growers.

d) L'ensemencement, en premier lieu, de toute souche isolée, sur Dubos oleic agar nous a permis, à 4 reprises, l'isolement de différents types de colonies. Nous avons pu ainsi séparer les espèces suivantes :

- 1) 1 *M. ranae* scotochromogène et 1 *M.* groupe III;
- 2) 1 *M. ranae* et 1 *Nocardia*;
- 3) 1 souche rose et 1 *M. gordonae*;
- 4) 1 souche rose et 1 *M. scrofulaceum*.

2. Identification des mycobactéries

a) *Mycobactéries à croissance rapide*

— Les tests d'identification que nous avons appliqués ne nous ont pas permis de préciser si les 2 souches de *M. chelonae* étaient des *M. abscessus* ou *M. borstelense*. Ces 2 souches ont des caractères à la fois de *M. abscessus* (citrate négatif) et de *M. borstelense* (Mac Conkey et NaCl négatifs). Nous ne sommes donc pas en mesure de confirmer les travaux de Stanford (Stanford *et al.*, 1971) concernant la répartition géographique de *M. chelonae*. La majorité des souches de *M. chelonae* sont résistantes à l'éthambutol (Portaels *et al.*, 1970); ce test n'a pas encore été appliqué à nos deux souches.

— Il est intéressant de signaler que toutes les souches de *M. ranae* isolées appartiennent au sérotype peregrinum; le mannitol est positif dans tous les cas ce qui confirme notre identification.

b) *Mycobactéries à croissance lente*

L'identification précise de *M. avium* et *M. intracellulare* ne sera possible que si nous agglutinons les souches avec les sérums adéquats.

Les réactions d'agglutination et le test des amidases nous permettront d'identifier avec plus de précision les mycobactéries du groupe II de Runyon.

c) *Mycobactéries à pigment rose* (tableau 3)

Un pourcentage non négligeable (21 p. cent) de mycobactéries à pigment rose a été isolé; plusieurs auteurs ont déjà signalé leur existence et un travail récent (Korsak *et al.*, 1972) les subdivise en 2 groupes. Nos souches, à part une exception, présentent toutes les mêmes caractères, que l'on retrouve à la fois chez *M. engbaeki* et *M. lactis* (Korsak *et al.*, 1972); elles se rapprochent de *M. engbaeki* par les caractères suivants :

nitratase : négatif;

phosphatase : fortement positif.

Elles se rapprochent de *M. lactis* par le fait qu'elles n'acidifient pas le fructose.

Nous avons également observé pour toutes ces souches une légère photochromogénéité.

Nous avons pu isoler de l'environnement des mycobactéries des groupes II, III et IV de Runyon. Nous n'avons pas observé de variations notables entre les différents biotopes étudiés et d'après la nature de l'échantillon. Aucune mycobactérie photochromogène n'a pu être isolée.

Cette absence de mycobactéries photochromogènes dans l'environnement a déjà été signalée par d'autres auteurs (Chapman, 1972, Meissner, 1970, Viallier, 1971). Signalons cependant que nous avons pu isoler d'aquarium du Zoo d'Antwerpen, 1 souche de *M. kansasii* (Pattyn *et al.*, 1971).

V. CONCLUSIONS

L'étude de 332 échantillons prélevés dans diverses régions du Bas-Zaïre nous a permis d'isoler 153 souches appartenant au genre *Mycobacterium* et 5 souches appartenant au genre *Nocardia*.

Il est difficile de tirer des conclusions écologiques de cette étude préliminaire réalisée sur un aussi petit nombre d'échantillons. Ce travail nous permet cependant de signaler que les mycobactéries se rencontrent partout dans la flore de l'environnement et que nous n'avons pas observé de variations notables entre les différents biotopes étudiés ni entre les différents types d'échantillons prélevés.

La plupart des mycobactéries isolées sont des germes saprophytaires qui se répartissent entre les groupes II, III et IV de Runyon; aucune souche photochromogène n'a été isolée (groupe I de Runyon). 39 p. cent des mycobactéries étudiées sont des germes potentiellement pathogènes et des représentants de chaque espèce reconnue comme telle ont été isolés (*M. ranae*, *M. chelonae*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare*). Une souche thermophobe voisine de *M. ulcerans* a particulièrement attiré notre attention; cette souche a été isolée à partir d'une plante située dans une région où de nombreux cas d'ulcères à *M. ulcerans* ont été observés. Des études plus approfondies de cette région et de cette souche pourraient affirmer ou infirmer nos conclusions.

L'étude des mycobactéries de l'environnement entamée au Bas-Zaïre confirme, comme plusieurs auteurs l'ont signalé, que les mycobactéries sont des germes ubiquitaires (Kubica *et al.*, 1963, Pattyn *et al.*, 1971, Viallier, 1971) et que l'environnement peut constituer une source d'infection non négligeable pour l'homme.

Le présent travail a été réalisé en partie au laboratoire de parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale à Kinshasa, et en partie au laboratoire de bactériologie de l'Institut de Médecine Tropicale à Antwerpen.

REFERENCES

- Beerwerth, W. et Schurman, J. (1969) : Zur Okologie der Mycobakterien. Zbl. Bakt. I Abt. Orig. **211**, 58-69.
- Bonicke, R. et Nolte, H. (1967) : Diamin-oxydasen in Mykobakterien. Zbl. Bakt. I. Orig. **202**, 479-487.
- Chapman, J. S. (1971) : The ecology of the atypical mycobacteria. Arch. Environ Health **22**, 41-46.
- Korsak, T. et Boisvert, H. (1972) : Mycobactéries à pigment rose. Ann. Inst. Pasteur **122**, 31-41.
- Kubica, G. P., Beam, R. E. et Palmer, J. W. (1963) : A method for the isolation of unclassified acid-fast bacilli from soil and water. Am. Rev. Resp. Dis. **88**, 718-720.
- Kubica, G. P. *et al.* (1972) : A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. Journ. Gen. Microbiol. **73**, 55-70.
- Meissner, G. (1970) : Epidémiologie des infections humaines à Mycobactéries atypiques : les origines de la contamination. Rev. Tuberc. & Pneumol. **34**, 5-16.
- Pattyn, S. R. (1970) : Reinvestigation of a number of strains identified as *Mycobacterium fortuitum*. Ann. Soc. Belge Med. Trop. **50**, 293-300.
- Pattyn, S. R. et Portaels, F. (1972) : Identification and clinical significance of mycobacteria. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A **219**, 114-140.
- Pattyn, S. R., Portaels, F., Boivin, A. et Van Den Breen, L. (1971) : Mycobacteria isolated from Zoo Aquaria. Acta Zool. Path. Antv. **52**, 65-72.
- Portaels, F. et Pattyn, S. R. (1970) : Resistance to ethambutol as an aid to the identification of *Mycobacterium friedmannii* (abscessus) and *M. borstelense*. Journ. Med. Microbiol. **3**, 674-676.
- Stanford, J. L., Pattyn, S. R., Portaels, F. et Gunthorpe, W. J. (1972) : Studies on *Mycobacterium chelonae*. Journ. Med. Microbiol. **5**, 177-182.
- Viallier, J. (1971) : Recherche sur la présence dans les eaux douces de mycobactéries. Rev. Inst. Pasteur Lyon **4**, 27-42.

H. Boisvert : Est-ce que le fait d'isoler des germes à la température de 37° et 30° vous donne un avantage manifeste ?

F. Portaels : Si je compare le nombre de mycobactéries que j'ai isolées à 28°, le nombre de mycobactéries que j'ai isolées à 37° et le nombre d'espèces que j'ai isolées à la fois à 28° et 37°, je constate quand même des différences. Il y a des souches que j'isole uniquement à 28° et que je ne retrouve pas à 37° et l'inverse. Seulement, dans quelques rares cas nous avons pu isoler d'un échantillon la même mycobactérie à 28° et à 37°. Je crois donc que l'incubation à deux températures différentes nous permet d'isoler un beaucoup plus grand nombre de mycobactéries.

A. Tacquet : Je voudrais simplement demander à Madame Portaels si elle avait établi une corrélation entre ses observations chez l'homme et ses observations faites dans la nature. Est-ce qu'elle a pu établir un rapprochement entre ses différentes constatations ?

F. Portaels : Non je n'ai encore fait aucune corrélation entre l'homme et la nature.
