

## Mise en place de la culture in vitro de *Mycobacterium ulcerans* à partir d'échantillons cliniques versus recherche de BAAR et détection du génome bactérien à Abidjan, Côte d'Ivoire

Implementation of in vitro culture of *Mycobacterium ulcerans* from clinical samples versus detection of acid-fast bacilli and bacterial genome in Abidjan, Côte d'Ivoire

B. Coulibaly · M.-D.G. Coulibaly-N'Golo · E. Ekaza ·  
N. Aka · K.R. N'Guessan · A. Baudryard · J.-M. Assandé ·  
N. Trébissou · F. Guédé-Guina · M. Dosso

Reçu le 16 octobre 2008 ; accepté le 21 avril 2009  
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2010

**Résumé** Les infections dues à *Mycobacterium ulcerans* constituent un problème de santé publique en Côte d'Ivoire. Le diagnostic étiologique par l'isolement de la bactérie par la culture se heurte à la lenteur et aux difficultés de réalisation de celle-ci. Le but de cette étude a été de mettre en routine la culture in vitro de *M. ulcerans* à partir d'exsudats et de biopsies cutanées de malades suspectés d'avoir un ulcère de Buruli. Une attention particulière a été portée sur le conditionnement de l'échantillon, depuis le prélèvement jusqu'à son acheminement au laboratoire et l'ensemencement sur milieu Löwenstein-Jensen supplémenté de glycérol. Quel que soit le type d'analyse réalisé, le taux de positivité obtenu à partir des biopsies est supérieur à celui obtenu à partir des exsudats. L'application de trois techniques d'analyse a donné des taux de positivité de 26,7, 57,4 et 17,8 %, respectivement à l'examen microscopique, par *nested-PCR* (nPCR) IS2404 directement à partir de l'échantillon et par culture. Le taux de contamination global par l'envahissement des trois tubes de culture par les champignons est de 15,8 %, avec respectivement des taux de 14,3 et 19,4 % à partir des exsudats et des biopsies. Tous les échantillons positifs à la

coloration de Ziehl-Neelsen et en culture ont été aussi positifs par nPCR. La nPCR a permis la confirmation du diagnostic étiologique de l'agent responsable des ulcérations cutanées. Nos résultats montrent que la culture, malgré la croissance difficile de la bactérie peut être réalisée dans un laboratoire à moyens modestes sous les tropiques. L'approvisionnement en réactifs et consommables constitue l'une des difficultés majeures dans la mise en œuvre de la culture. Seule sa mise en place permettra la réalisation des tests de sensibilité in vitro et in vivo en vue d'une meilleure prise en charge des malades de l'ulcère de Buruli.

**Mots clés** *Mycobacterium ulcerans* · Culture · PCR IS2404 · Diagnostic · Confirmation · Abidjan · Côte-d'Ivoire · Afrique intertropicale

**Abstract** *Mycobacterium ulcerans* infections are a public health problem in Côte d'Ivoire. The etiological diagnosis of this disease made by culture remains a big concern due to the slowness and difficulties encountered. This detection by culture of *M. ulcerans* represents a big interest as it allows obtaining the circulating strains for research. The purpose of this study was to determine on a routine basis in a poorly equipped laboratory, in vitro culture of *M. ulcerans* from exudates of skin ulcerations and from biopsy of patients with suspected Buruli ulcer. A particular attention was paid to the conditioning of the sample forwarded to the laboratory and inoculation in Lowenstein-Jensen medium supplemented with glycerol. The results of the three methods for the analysis showed 26.7, 57.4 and 17.8% positive rate respectively in the microscopy examination by nested PCR and by culture. In all the analysis, the positive rate from biopsy is higher than that obtained from exudates. The overall contamination rate by invasion of the three tubes of

B. Coulibaly · N. Aka · K.R. N'guessan · A. Baudryard ·  
J.-M. Assandé · M. Dosso

Unité des mycobactéries tuberculeuses et atypiques, département  
de bactériologie-virologie, institut Pasteur de Côte-d'Ivoire,  
BP 490 Abidjan 01, Côte-d'Ivoire

M.-D.G. Coulibaly-N'Golo · E. Ekaza (✉) · M. Dosso  
Unité de microbiologie moléculaire, département de bactériologie-  
virologie, institut Pasteur de Côte-d'Ivoire,  
BP 490 Abidjan 01, Côte-d'Ivoire  
e-mail : ekazae@yahoo.fr

B. Coulibaly · N. Trébissou · F. Guédé-Guina  
Laboratoire de pharmacodynamie biochimique, UFR bioscience,  
université de Cocody, 22 BP 582 Abidjan, Côte-d'Ivoire

culture by fungi is 15.8 with 14.3 and 19.4% respectively, from exudates and biopsies. All positive samples in Ziehl-Neelsen staining and in culture were also positive by nested PCR. The nested PCR confirmed the positive strains found in culture, which were responsible for skin ulcerations. After culture, only one strain was nPCR negative. This strain was identified as *Mycobacterium Gordonae*. Our culture conditions showed that *M. ulcerans* was not the only strain identified and that other strains were present in the culture. We can conclude that the culture of *M. ulcerans*, in spite of the growth difficulties of the bacterium can be performed in laboratory in developing countries despite the lack of reagent and consumables. The implementation of this culture is the only way to determine sensitivity tests in vitro and in vivo in order to treat patients with Buruli ulcer.

**Keywords** *Mycobacterium ulcerans* · Culture · PCR IS2404 · Diagnosis · Confirmation · Abidjan · Côte-d'Ivoire · Sub-Saharan Africa

## Introduction

L'ulcère de Buruli est une infection de la peau conduisant à des séquelles inesthétiques et handicapantes. L'agent étiologique de cette maladie, *Mycobacterium ulcerans*, est répandu dans le monde. Le continent le plus touché est l'Afrique [5,6,11] et la Côte-d'Ivoire est le pays le plus atteint avec plus de 2 000 nouveaux cas par an.

Cette maladie est la deuxième mycobactériose après la tuberculose et avant la lèpre [7]. L'affection touche particulièrement les agriculteurs, ce qui conduit à une baisse des activités économiques, et les enfants de 0 à 15 ans, ce qui occasionne de nombreuses déscolarizations. Malgré les nombreuses études effectuées, les connaissances scientifiques sur la pathologie restent limitées, notamment en ce qui concerne le réservoir et le mode de transmission de *M. ulcerans*. Des traitements antibiotiques efficaces existent [2,4,15], mais la méconnaissance de l'ulcère de Buruli entraîne des retards importants dans le diagnostic et le traitement des cas. Jusqu'en 2000, en Côte-d'Ivoire, le diagnostic de cette affection était porté devant une ulcération sur les seuls arguments cliniques, sans confirmation microbiologique. Or, cette confirmation est nécessaire du fait de la diversité des formes cliniques et de nombreux diagnostics différentiels [12]. La confirmation du diagnostic repose essentiellement sur la détection et la culture des bactéries à partir des prélèvements réalisés au niveau de la lésion. Compte tenu de la croissance lente de *M. ulcerans* (six à huit semaines à 29-32 °C pour les premières colonies) [14], l'amplification du génome bactérien demeure la méthode de diagnostic la plus rapide et la plus sensible [9]. La culture de *M. ulcerans* présente un grand intérêt épidémiologique car

elle permet de caractériser les souches circulantes, étape indispensable à la détermination de la résistance de *M. ulcerans* aux antibiotiques.

L'objectif de cette étude était de mettre en place une méthode de culture in vitro afin d'isoler des souches circulantes de *M. ulcerans* en Côte-d'Ivoire à partir d'exsudats et de biopsies cutanées transportés en présence d'accumulateurs de froid et de comparer les performances de cette technique à la microscopie directe et à l'amplification du génome bactérien par *nested-PCR* (nPCR). Cette étude a eu l'accord du Programme national de lutte contre l'ulcère de Buruli de Côte-d'Ivoire.

## Matériel et méthodes

### Échantillons

Les échantillons de notre étude étaient composés de 70 écouvillonnages d'exsudats cutanés et 31 biopsies cutanées, prélevés chez 53 patients chez qui il y avait une forte suspicion d'ulcère de Buruli. Les échantillons ont été collectés de mars 2005 à septembre 2006 chez des patients hospitalisés à l'institut Raoul-Follereau d'Adzopé, à 105 km au nord-est d'Abidjan, et au centre anti-ulcère de Buruli Demi-Émile, situé à Abidjan.

Pour être des produits biologiques pertinents pour le diagnostic de l'ulcère de Buruli, ces prélèvements ont été réalisés sous les bords décollés de la peau et au niveau de la graisse sous-cutanée, là où se multiplie *M. ulcerans*.

Du fait de l'illettrisme de la grande majorité des patients, un consentement oral de chacun ou du tuteur pour les enfants mineurs a été au préalable obtenu.

### Traitement des échantillons

#### *Exsudats*

Quatre écouvillons de sérosité ont été réalisés par site d'ulcération chez chaque patient. Ces écouvillons ont été immédiatement déchargés dans un tube contenant 2 ml d'un mélange de milieu Middelbrook 7H9 (Difco) supplémenté de chlorure de cétalpyridinium monohydraté (Sigma) à 1 % (CPC) dans un rapport (quatre volumes 7H9 et deux volumes CPC).

#### *Biopsies*

Des prélèvements profonds de peau qui vont jusqu'à l'hypoderme ont été effectués. Les échantillons ont été déposés immédiatement dans 2 ml du mélange 7H9 + CPC.

Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire dans une glacière contenant des accumulateurs de froid conservés au préalable à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les échantillons ont été traités immédiatement ou conservés à  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour éviter l'effet de la congélation sur les bactéries. Les échantillons conservés ont été traités dans la semaine suivant le prélèvement.

L'addition au milieu de transport du CPC, un antiseptique actif, a été faite dans le but d'inhiber la prolifération des bactéries de surinfection dans les échantillons.

## Examen microscopique

### Écouvillonnages

Ils ont été mélangés directement par agitation au vortex dans le milieu de transport avant centrifugation à 3 000 trs/min pendant 20 minutes. Le culot est suspendu dans 2 ml de NaCl à 9 ‰ et le frottis est réalisé sur 150  $\mu\text{l}$  de la suspension.

### Biopsies

Les pièces opératoires ont été déposées dans une boîte de Pétri stérile et découpées en petits morceaux à l'aide d'une lame de bistouri stérile n° 24 avant leur broyage dans un mortier. Le broyat réalisé dans 2 ml du mélange 7H9 + CPC est traité comme les écouvillonnages pour la réalisation du frottis.

Les frottis ont été observés après une coloration de Ziehl-Neelsen à chaud pour la recherche de bacilles acidoalcoolo-résistants (BAAR).

## Culture

### Écouvillonnages

Un volume de 100  $\mu\text{l}$  de la suspension est ensemencé directement, sans décontamination préalable, sur trois tubes de milieu Löwenstein-Jensen supplémenté avec 0,75 % de glycérol (L-J + glycérol).

### Biopsies

Le culot de centrifugation du broyat subit une décontamination par la méthode de Petroff modifiée. Le culot de décontamination est mis en suspension dans 1 ml de NaCl à 9 ‰, et 100  $\mu\text{l}$  de la suspension sont inoculés sur trois tubes de milieu L-J + glycérol. Les tubes inoculés sont incubés plusieurs semaines à  $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , et le temps d'apparition des colonies visibles est noté.

L'envahissement des tubes de culture par les champignons traduit une contamination de la culture et empêche la croissance de *M. ulcerans*. Un échantillon est considéré contaminé lorsque les trois tubes ensemencés sont tous

envahis par les champignons au cours de l'incubation. Cette contamination traduit la perte de l'échantillon.

## Amplification par nPCR

La détection d'une portion spécifique du génome de *M. ulcerans* s'est faite par nPCR conventionnelle ciblant la séquence d'insertion IS2404 selon une technique précédemment décrite [13]. Brièvement, l'ADN a été extrait des différents échantillons comme précédemment décrit [3] avant d'être soumis à la nPCR utilisant les amorces externes MU1 (5' GGCAGGCTGCAGATGGCATA 3') et MU2 (5'GGCAGTTACTTCACTGCACA3') [13] et les amorces internes PGP3 (5' GGCGCAGATCAACTTCGCGGT 3') et PGP4 (5' CTGCGTGGTGCTTTACGCGC 3'). La présence d'amplicons de taille attendue, respectivement de 568 et de 217 pb, a été recherchée après électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium à 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . La confirmation de la présence de *M. ulcerans* en culture a été aussi déterminée sur les colonies par nPCR.

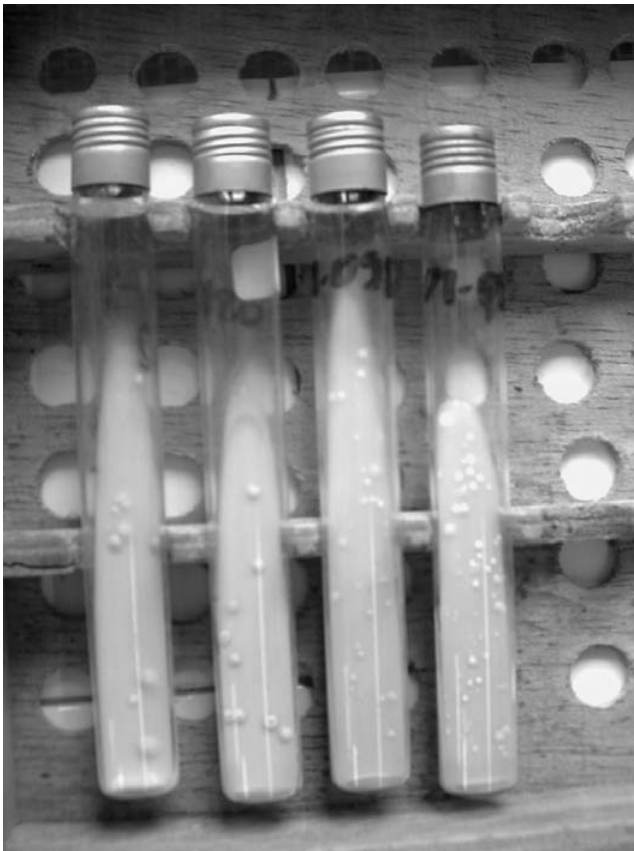
La présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADN obtenus à partir des colonies a été recherchée en ciblant, dans une autre amplification, la séquence IS6110 des mycobactéries selon le protocole décrit par Wilton et Cousins [16].

## Résultats

L'étude a porté sur un total de 101 échantillons, dont 70 écouvillons d'exsudats cutanés et 31 biopsies, prélevés chez des patients présentant une forte suspicion d'ulcère de Buruli. Le génome de *M. ulcerans* a été détecté directement dans 58 des 101 échantillons (57,4 %), dont 36/70 des exsudats (51 %) et 22/31 (71 %) des biopsies cutanées.

La recherche de BAAR par microscopie après coloration de Ziehl-Neelsen a été positive dans 27 des 101 échantillons (26,7 %), dont 17/70 (24 %) des exsudats et 10/31 des biopsies cutanées (32 %). Sur 19 des 101 échantillons (18,8 %), des colonies de mycobactéries ont été détectées par culture, après 45 jours d'incubation pour les premières. En moyenne, la croissance des souches a été visible sept semaines après incubation à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. 1). Huit cultures positives (11,4 %) étaient issues d'exsudats, et 11 (35,5 %) provenaient des biopsies cutanées. Le taux de contamination global des cultures était de 15,8 % (16/101), avec respectivement des taux de 14 % (10/70) et 19 % (6/31) dans les exsudats et dans les biopsies.

La concordance des résultats des trois types d'analyses effectuées montre que six échantillons (trois de chaque type d'échantillon) sont positifs à la fois pour les trois techniques (Tableau 1). Dix-huit échantillons (huit exsudats et dix biopsies) sont à la fois positifs pour deux des méthodes diagnostiques (culture et nPCR) mais négatifs en



**Fig. 1** Mise en évidence de *M. ulcerans* par culture. Colonies rugueuses et jaunâtres de *M. ulcerans* obtenues après culture sur milieu Löwenstein-Jensen + glycérol. Le temps d'incubation pour apercevoir les premières colonies sur les tubes de culture est respectivement, de gauche vers la droite, de 54, 46, 48 et 51 jours.

microscopie (BAAR) ; un seul échantillon de biopsie était positif uniquement en culture. Aucun échantillon négatif en nPCR n'était à la fois positif en culture et à l'examen direct par la recherche de BAAR (Tableau 1).

La détection de *M. ulcerans* a été confirmée par nPCR sur 18 des 19 cultures positives. L'absence de détection du génome de *M. ulcerans* a été observée sur les colonies d'un

échantillon de biopsie dont le temps de croissance était de sept jours. Après confirmation, il est apparu que la nPCR n'était pas en cause, la souche étant une mycobactérie atypique, n'appartenant pas à l'espèce *M. ulcerans* et isolée chez un patient infecté par le VIH1.

## Discussion

L'infection due à *M. ulcerans* connaît une recrudescence dans le monde en général et en particulier en Côte-d'Ivoire. Plusieurs études ont été réalisées sur différents aspects : épidémiologique, clinique, biologique et thérapeutique.

Notre étude a porté sur l'isolement en culture de l'agent étiologique de l'ulcère de Buruli à partir de deux types d'échantillons biologiques. Le nombre d'échantillons d'exsudats était supérieur à celui des biopsies. Cela s'explique par le fait que ces prélèvements sont faciles à réaliser et peu coûteux, alors que les biopsies nécessitent le plus souvent un environnement hospitalier avec un opérateur expérimenté.

Les éléments ou les états mis en évidence par les trois techniques sont le caractère acidoalcoolorésistant lié à la richesse en lipides de la paroi bactérienne pour la coloration de Ziehl-Neelsen, la bactérie vivante pour la culture et le génome bactérien pour la nPCR. Le taux de positivité par type d'échantillon pour chaque technique est plus élevé avec les biopsies qu'avec les exsudats, constat déjà fait lors d'autres études [3,8]. Cela s'expliquerait par le fait que *M. ulcerans* est une bactérie microaérophile, et sa multiplication in vivo est plus aisée en profondeur dans les lésions cutanées [10]. De ce fait, les biopsies cutanées constituent l'échantillon de choix pour le diagnostic bactériologique de l'ulcère de Buruli malgré les difficultés de réalisation.

Dans le cas des exsudats, les faibles taux de positivité obtenus seraient liés soit au faible inoculum bactérien de ces échantillons, soit à des prélèvements effectués superficiellement sur les lésions. Dix-neuf échantillons ont donné des colonies caractéristiques de *M. ulcerans*. Le milieu utilisé (Middlebrook 7H9 + CPC) n'a pas un effet véritablement

**Tableau 1** Taux de positivité de la culture de *M. ulcerans* en fonction du type d'échantillon et des résultats de la microscopie et de la nPCR

| Type d'échantillon | Microscopie/nPCR | Culture     |         |
|--------------------|------------------|-------------|---------|
|                    |                  | Positif (%) | Négatif |
| Exsudat (n = 70)   | BAAR+/nPCR+      | 3 (18 %)    | 14      |
|                    | BAAR-/nPCR+      | 5 (26 %)    | 14      |
|                    | BAAR+/nPCR-      | 0 (-)       | 0       |
|                    | BAAR-/nPCR-      | 0 (-)       | 34      |
| Biopsie (n = 31)   | BAAR+/nPCR+      | 3 (30 %)    | 7       |
|                    | BAAR-/nPCR+      | 7 (58 %)    | 5       |
|                    | BAAR+/nPCR-      | 0 (-)       | 0       |
|                    | BAAR-/nPCR-      | 1 (11 %)    | 8       |

(+) = positif ; (-) = négatif ; n = nombre total de l'échantillon.

nocif sur les mycobactéries et est adapté pour leur transport. Les taux de contamination de notre étude, quels que soient le type d'échantillon et le traitement subi avant mise en culture, sont inférieurs à ceux obtenus par Yeboah-Manu et al. [17]. En revanche, nos taux de croissance bactériennes sont inférieurs. Cette différence pourrait s'expliquer dans une certaine mesure par les traitements locaux que nos patients ont utilisés en automédication avant la réalisation des prélèvements et aussi par la difficulté de réalisation de la culture de cette bactérie.

Au final, le taux général de croissance réel de *M. ulcerans* dans nos conditions est de 17,8 %. Ce taux est plus important avec les biopsies qu'avec les exsudats. L'extraction de l'ADN en vue de la nPCR est réalisée sur le culot après mise en culture. Cet ordre de traitement des échantillons a été adopté du fait de la bonne sensibilité de la détection moléculaire par rapport aux deux autres types d'analyses. La technique détecte le génome de bactéries vivantes et/ou mortes. Cette bonne sensibilité est confirmée par les résultats BAAR (-)-nPCR (+)-culture (-) dans les deux types d'échantillons analysés. Malgré la suspicion clinique d'ulcère de Buruli, la présence de l'agent responsable n'a pu être mise en évidence dans les échantillons BAAR (-)-nPCR (-)-culture (-) (Tableau 1). Cette absence peut être due à la qualité du prélèvement, à l'automédication des patients réalisée avant le prélèvement ou à l'implication d'autres agents infectieux autres que *M. ulcerans*.

La nPCR semble être le meilleur test pour confirmer un cas cliniquement suspect d'ulcère de Buruli et est réalisable directement sur des échantillons cliniques. La détection de la séquence IS2404 de *M. ulcerans* par nPCR ne peut poser un problème au niveau de la spécificité que lorsque l'analyse porte sur des échantillons de l'environnement, car d'autres mycobactéries de l'environnement portent la même séquence [1]. En dehors des difficultés intrinsèques de croissance de la bactérie [14], l'approvisionnement en réactifs et consommables constitue l'autre problème majeur de la mise en place de la culture. En effet, ne disposant pas de fabricants locaux, ces intrants sont vendus par des revendeurs à des prix atteignant dix fois les prix initiaux indiqués par les fabricants.

La commande directe des intrants nécessaires à la culture est, quant à elle, confrontée aux tracasseries douanières et au non respect, par les transitaires, des conditions de conservation imposées par les fabricants pour garantir la qualité des résultats.

## Conclusion

Cette étude a permis de mettre en place, dans nos conditions de travail, la culture de *M. ulcerans* à partir de deux types d'échantillons biologiques humains. Une attention particulière a été portée sur le recueil des échantillons. Ils ont été immédiatement mis en suspension dans un milieu contenant

une substance qui inhibe la prolifération des micro-organismes banals, transportés en présence d'accumulateurs de froid, conservés à +4 °C et traités dans les sept jours suivant leur recueil.

Les conditions décrites pour cette culture in vitro sont aussi favorables à la croissance de mycobactéries autres que *M. ulcerans*. La culture de ce micro-organisme, bien que peu sensible en général, présente un intérêt épidémiologique par l'étude d'empreintes génétiques pour l'étude de la diversité génétique de ces souches en circulation et un intérêt thérapeutique par l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. La culture et la confirmation étiologique de l'ulcère de Buruli sont nécessaires pour une meilleure prise en charge des malades, même à un stade tardif de la maladie.

**Conflit d'intérêt :** aucun.

## Références

1. Chemlal K, Huys G, Laval F, et al (2002) Characterization of an unusual mycobacterium: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 40:2370–80
2. Chauty A, Ardant MF, Adeye A, et al (2007) Promising clinical efficacy of streptomycin–rifampin combination for treatment of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *Antimicrob Agents Chemother* 51:4029–35
3. Ekaza E, Kacou-N'douba A, Oniangue NC, et al (2004) Apport de l'amplification génique dans la détection de *Mycobacterium ulcerans* dans les exsudats et les biopsies cutanées en Côte-d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot* 97:95–6 [http://www.pathexo.fr/pages/articles/2004/2004-T97-2/2547.html]
4. Etuafal S, Carbonnelle B, Grosset J, et al (2005) Efficacy of the combination rifampin–streptomycin in preventing growth of *Mycobacterium ulcerans* in early lesions of Buruli ulcer in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3182–6
5. Goutzamanis JJ, Gilbert GL (1995) *Mycobacterium ulcerans* infection in Australian children: report of eight cases and review. *Clin Infect Dis* 21:1186–92
6. Grosset J, Boisvert H, Truffot-Pernot CH (1989) Mycobactéries. In: *Bactériologie médicale*. 2<sup>e</sup> Ed. Flammarion, pp. 965–86
7. Kanga JM, Kacou ED (2001) Aspects épidémiologiques de l'ulcère de Buruli en Côte-d'Ivoire : résultats d'une enquête nationale. *Bull Soc Pathol Exot* 94:46–51. [http://www.pathexo.fr/pages/articles/2001/2001-T94-1/2193.html]
8. Lagarrigue V, Portaels F, Meyers WM, Aguiar J (2000) L'ulcère de Buruli : attention aux atteintes osseuses à propos de 33 cas observés au Bénin de 1996 à 1999. *Med Trop* 60:262–6
9. OMS (2008) Ulcère de Buruli : rapport de situation, 2004–2008. *Relevé épidémiologique hebdomadaire* 17:145–54
10. Palomino JC, Portaels F (1998) Effects of decontamination methods and culture conditions on viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC System. *J Clin Microbiol* 36:402–8
11. Portaels F, Fonteyne PA, de Beenhouwer H, et al (1996) Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. *J Clin Microbiol* 34:962–5
12. Portaels F, Johnson P, Meyers WM (2001) Buruli ulcer: diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* disease. World Health Organization, Geneva. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\_CDS\_CPE\_GBUI\_2001.4.pdf]

13. Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, et al (1997) Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative diseases. *Appl Environ Microbiol* 63:4135–8
14. Tsang AY, Farber ER (1973) The primary isolation of *Mycobacterium ulcerans*. *Am J Clin Pathol* 59:688–92
15. van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, et al (2005) *Mycobacterium ulcerans* disease. *Bull World Health Organ* 83:785–91
16. Wilton S, Cousins D (1992) Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl* 1:269–73
17. Yeboah-Manu D, Bodmer T, Mensah-Quainoo E, et al (2004) Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens. *J Clin Microbiol* 42:5875–6