

## COMPARAISON DE DEUX MILIEUX DE CULTURE POUR L'ISOLEMENT DE MYCOBACTERIES TUBERCULEUSES

par

P. PAUWELS<sup>1,2</sup>, M.B. KALONGA<sup>1</sup>, S.K. SYKALON<sup>1</sup>  
J.C. WILLAME<sup>1</sup> & G. CARPELS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bureau National de la Tuberculose, B.P. 67, Kinshasa 1, Zaïre

<sup>2</sup>Coopération Médicale Belgo-Zaïroise. AGCD, Bruxelles, Belgique

<sup>3</sup>Institut de Médecine Tropicale, Anvers, Belgique

---

**Résumé** — Les résultats des milieux de Löwenstein-Jensen et d'Ogawa à 1% et au jaune d'œuf pour l'isolement de mycobactéries ont été comparés à Kinshasa, Zaïre, dans 392 cultures positives. Le milieu d'Ogawa, bien que considéré comme mieux adapté à la croissance des mycobactéries atypiques, n'a pourtant pas permis d'augmenter leur taux très bas de positivité observé les années précédentes dans la population de tuberculeux à Kinshasa par culture sur Löwenstein-Jensen. Par contre, le milieu d'Ogawa s'est avéré significativement plus sensible que le milieu de Löwenstein-Jensen pour l'isolement de *M. tuberculosis* (95.9% vs 88.4%). L'utilisation du milieu d'Ogawa nous semble donc recommandable si les conditions de fabrication peuvent être remplies.

---

KEYWORDS: *Mycobacterium tuberculosis*; Culture Media; Zaïre

---

### Introduction

L'isolement des mycobactéries se fait habituellement sur le milieu de Löwenstein-Jensen (LJ). Certaines mycobactéries, dites « atypiques » se développent mal, voire pas du tout, sur ce milieu (4). Le milieu d'Ogawa à 1% (OG), avec son pH aux environs de 6, semble mieux adapté à la plupart des mycobactéries atypiques (2). L'avantage du milieu OG par rapport au milieu LJ n'a jamais été étudié jusqu'à présent pour les mycobactéries du complexe tuberculeux (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*).

Durant l'année 1988 nous avons réalisé une étude comparative sur l'utilité de ces deux milieux au laboratoire du Bureau National de la Tuberculose à Kinshasa, Zaïre, en ensemençant les deux milieux en parallèle pour les primocultures de mycobactéries.

Le but de l'étude était de vérifier si l'utilisation du milieu OG permet d'augmenter le nombre d'isollements de mycobactéries atypiques dans la population de tuberculeux à Kinshasa. Le nombre de cultures positives et la vitesse de croissance pour *M. tuberculosis* ont également été comparés sur chaque milieu.

### Matériel et méthodes

#### *Produits pathologiques*

Un total de 392 cultures positives de mycobactéries provenant de divers produits pathologiques ont été utilisées pour cette étude. Ils provenaient de

patients ambulatoires consultant au Centre de Dépistage de la Tuberculose à Kinshasa, qu'il s'agisse de premiers traitements ou de reprises de traitements, en début ou pendant ceux-ci. Le tableau 1 donne la nature de ces prélèvements.

TABLEAU 1  
Nombre d'échantillons par nature de prélèvement

Natures des prélèvements	Nombre d'échantillons	%
Expectorations	309	78,8
Liquides pleuraux	45	11,5
Sucs ganglionnaires	38	9,7
<b>Total</b>	<b>392</b>	<b>100,0</b>

### *Milieux de cultures*

Le milieu LJ a été fabriqué à partir d'une base déshydratée (Bacto Löwenstein Medium Base, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) selon les instructions du fabricant.

Le milieu OG a été fabriqué par nos soins comme suit (2) : 100 ml d'eau distillée, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de glutamate de sodium et 6 ml de glycérol étaient mélangés et puis autoclavés à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement 200 ml de jaune d'œuf et 5 ml d'une solution aqueuse stérile de vert de malachite à 2% y furent ajoutés, donnant un pH final du milieu de 5.9 à 6.1. Le milieu fut réparti dans des tubes en verre avec bouchon à vis de 16.5 x 165 mm à raison de 5 ml par tube. Il a été coagulé en position inclinée à 85°C durant 40 minutes. Il a subi une tyndalisation à un jour d'intervalle à 75°C pendant 30 minutes.

### *Préparation de l'inoculum et incubation*

L'homogénéisation et la décontamination des expectorations ont été réalisées selon la méthode au lauryl-sulfate de sodium (7). Les prélèvements des sucs ganglionnaires ainsi que les liquides pleuraux ont étéensemencés sans décontamination préalable. La distribution de l'inoculum s'est faite à la pipette Pasteur à raison de 8 gouttes maximum (+/- 0.2 ml) par tube. Un seul tube de chaque milieu a étéensemencé avec chacun des prélèvements. La température d'incubation a été de 37°C. Les cultures ont été examinées chaque semaine durant 8 semaines, et ont été écartées ensuite.

### *Identification*

Chaque échantillon dont au moins un des deux milieux étaient contaminés a été rejeté pour cette étude. Pour toutes les colonies macroscopiquement

visibles et suspectes d'être des mycobactéries, les tests suivants ont été réalisés :

- coloration de Ziehl-Neelsen;
- test à la niacine (Bacto TB NIACIN TEST STRIPS, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA);
- culture en présence d'acide thiophène-2-carboxylique (TCH);
- réduction des nitrates.

Nous avons retenu comme *Mycobacterium tuberculosis* tout bacille répondant aux caractères suivants :

- bacilles acide-alcool-résistant;
- niacine positif;
- résistant à 5  $\mu\text{g}$  de TCH/ml de milieu;
- réduisant les nitrates en nitrites (1).

Les souches ne répondant pas à ces critères ont été identifiées à l'Institut de Médecine Tropicale à Antwerpen, Belgique.

### *Etude statistique*

Le paramètre étudié était le taux de positivité sur chaque milieu (nombre de tubes positifs sur le total de tubes retenus). Les risques relatifs ont été calculé comme les rapports des taux de positivité (Ogawa) sur les taux de positivité (LJ) pour les différentes natures de prélèvements. Le test de chi carré a été utilisé et pour les résultats significatifs, l'intervalle de confiance unilatéral (95 %) a été calculé autour du risque relatif.

### **Résultats**

Parmi les 392 mycobactéries étudiées, 388 (99 %) ont été identifiées à Kinshasa comme *M. tuberculosis*. Les 4 autres ont été identifiées à Antwerpen, comme : 2 *M. avium* et 2 *M. terrae*. Ceci ne représente pas une augmentation par rapport aux années précédentes (1 % en 88, 0.7 % en 87, 1.6 % en 86) (6). Ces mycobactéries atypiques se sont développées sur les 2 milieux étudiés et avec une vitesse de croissance identique; elles provenaient toutes d'expectorations.

Comme le montre le tableau 2, parmi les 388 cultures de *M. tuberculosis* 343 (88,4 %) se sont développées endéans les 8 semaines sur LJ. Sur OG 372 cultures se sont développées (95,9 %). Cette différence est significative ( $p < 0.01$ ) pour les expectorations et pour le total des prélèvements. Le rapport du taux de positivité (OG) sur le taux de positivité (LJ) était de 1.08. Donc, le milieu d'Ogawa donnait 8 % de positifs en plus que le milieu LJ. L'intervalle de confiance unilatéral (95 %) était de 1.04. Ceci veut dire que, si l'on répète cette étude, dans 95 % des cas on aura au moins 4 % de positifs en plus sur Ogawa.

Lorsque le germe d'un même malade s'était développé sur les 2 milieux, nous avons mesuré la vitesse de croissance de ce germe sur chacun des

milieu. Un total de 333 germes de malades différents ont montré une croissance sur les 2 milieux. Parmi ceux-ci 288 avaient eu une vitesse de croissance identique (86,5 %). Pour 45 germes (13,5 %) la vitesse de croissance n'a pas été identique sur les 2 milieux, mais les différences observées sont minimes.

TABLEAU 2  
Nombre et pourcentage de cultures de *M. tuberculosis* sur le milieu LJ et sur le milieu OG à 8 semaines

Nature du prélèvement	Nombre d'échantillons ayant poussé sur :								% OG %LJ	p
	n	LJ et OG				Total LJ		Total OG		
		LJ*	OG*	nombre	%	nombre	%			
		LJ*	OG*							
Expectoration	305	258	13	34	271	88,85	292	95,74	1,08	× ×
Liq. pleuraux	45	38	2	5	40	88,89	43	95,56	1,08	NS
Sucs gangl.	38	31	1	6	32	84,21	37	97,37	1,16	NS
Totaux	388	327	16	45	343	88,40	372	95,88	1,08	× ×

LJ : Löwenstein-Jensen  
OG : Ogawa  
LJ\* : Löwenstein-Jensen uniquement  
OG\* : Ogawa uniquement

× × :  $p < 0,01$   
NS : non significatif

## Discussion

Le principal avantage du milieu OG sur le milieu LJ est de permettre, grâce à un pH plus acide, une meilleure croissance des mycobactéries atypiques. Contrairement à ce que l'on observe dans les pays industrialisés, ces germes sont très rarement responsables de mycobactérioses dans les pays en voie de développement (3, 5). Ce fait a pu être corroboré par notre étude car nous avons effectivement rencontré un faible pourcentage de tels germes à Kinshasa, et l'utilisation du milieu OG ne nous a pas permis d'augmenter ce pourcentage par rapport aux années précédentes. Il est même probable que sur les 4 mycobactéries atypiques isolées, seul les 2 *M. avium* trouvés chez le même malade en l'absence de *M. tuberculosis* et à 2 moments différents avaient une signification clinique, les *M. terrae* étant considérés comme non pathogènes.

Cependant le milieu OG s'est avéré plus sensible que le milieu LJ pour l'isolement de *M. tuberculosis*. Si on détaille les résultats en fonction de la nature des échantillons, on constate que la différence est significative pour les expectorations, mais pas pour les liquides pleuraux et sucs ganglionnaires, bien que les pourcentages de positivité soient comparables à ceux des expectorations. Un plus grand nombre de liquides pleuraux et sucs ganglionnaires permettrait peut-être de trouver une différence significative. Nous pensons que le pH du milieu OG, plus proche du pH optimal de développement de *M. tuberculosis* (4) a joué un rôle important pour augmenter la sensibilité du milieu OG.

La légère différence non significative de vitesse de croissance en faveur du milieu OG ne permet pas de conclure à une supériorité de ce milieu à cet égard.

## Conclusion

Vu sa sensibilité plus élevée, l'utilisation du milieu OG nous semble justifiée pour l'isolement des mycobactéries du complexe tuberculeux. La sensibilité supérieure ne doit pas faire perdre de vue les inconvénients que comporte la nécessité d'un équipement de laboratoire plus sophistiqué (balance de précision, pH mètre, ...), une manipulation plus délicate et le coût des réactifs de base (œufs). C'est en fonction de ces divers éléments que sera fait le choix entre LJ et OG.

Remerciements. — *Nous tenons à remercier le Professeur F. Portaels et le Professeur J. Prignon qui ont bien voulu revoir notre manuscrit. Nous remercions également M. Mans pour la dactylographie du manuscrit.*

### Comparison of two culture media for tuberculous mycobacteria.

*Summary.* — In Kinshasa, Zaire, 392 positive cultures were used to compare the isolation of mycobacteria on two different culture media (Löwenstein-Jensen and Ogawa (1%) with egg yolk). Although the Ogawa medium is reknown for being well adapted to the growth of atypical mycobacteria, we did not isolate more atypical mycobacteria from the tuberculous population of Kinshasa on Ogawa than were isolated in the previous years on Löwenstein-Jensen. However, significantly more *M. tuberculosis* were isolated on Ogawa (95% versus 88.4% on Löwenstein-Jensen). Other factors permitting, the use of the Ogawa medium is recommended.

### Vergelijking van twee groeibodems voor het kweken van tuberculeuze mycobacteriën.

*Samenvatting.* — Het isoleren van mycobacteriën werd vergeleken op twee verschillende groeibodems (Löwenstein-Jensen en Ogawa (1%) met eigeel) aan de hand van 392 positieve kulturen, te Kinshasa, Zaïre. Alhoewel het Ogawa milieu bekend staat als zeer geschikt voor het kweken van atypische mycobacteriën waren we niet in staat om meer atypische mycobacteriën te isoleren uit de tuberculozen van Kinshasa op Ogawa dan vorige jaren op Löwenstein-Jensen. Er werden wel significant meer *M. tuberculosis* geïsoleerd op Ogawa dan op Löwenstein-Jensen (95.9% vs 88.4%). Indien het vervaardigen van de Ogawa groeibodem mogelijk is, lijkt het gebruik ervan ons aangewezen.

Reçu pour publication le 6 avril 1990.

## REFERENCES

1. American Society for Microbiology (ed): Manual of Clinical Microbiology (3rd edition). Chapter 14, Mycobacterium. 1980, Washington DC.
2. Pattyn SR, Portaels F: *In vitro* cultivation and characterization of *M. lepraemurium*. Int. J. Lepr., 1980, **48**, 7-14.
3. Portaels F: Le SIDA et les mycobactéries atypiques. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 1987, **67**, 93-116.
4. Portaels F, Pattyn SR: Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1982, **133B**, 213-221.
5. Pouthier-Simon F, Willame JC, Prignon J: Croissance des mycobactéries à partir de frottis secs d'expectorations. Identification et sensibilité des souches de Kinshasa, Zaïre. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 1987, **61**, 503-515.
6. Rapports annuels du Bureau National de la Tuberculose. Kinshasa, Zaïre.
7. Tison F, Carbonnelle B: Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Lille, Rouan et Roques, 1972.