

Détection des signatures moléculaires de *Mycobacterium ulcerans* chez des punaises aquatiques capturées au Bénin en dehors de leur environnement aquatique

Estelle Marion, Caroline Deshayes, Annick Chauty, Viviane Cassisa, S. Tchibozo, Jane Cottin, Julien Marie C. Doannio, Agnès Marot, Laurent Marsollier

► To cite this version:

Estelle Marion, Caroline Deshayes, Annick Chauty, Viviane Cassisa, S. Tchibozo, et al.. Détection des signatures moléculaires de *Mycobacterium ulcerans* chez des punaises aquatiques capturées au Bénin en dehors de leur environnement aquatique. *Medecine et sante tropicales*, John Libbey Eurotext, 2011, 71 (2), pp.169-172. hal-03333808

HAL Id: hal-03333808

<https://hal.univ-angers.fr/hal-03333808>

Submitted on 3 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Détection des signatures moléculaires de *Mycobacterium ulcerans* chez des punaises aquatiques capturées au Bénin en dehors de leur environnement aquatique

Marion E¹, Deshayes C¹, Chauty A², Cassisa V¹, Tchibozo S³, Cottin J^{1,4}, Doannio J⁵, Marot A¹, Marsollier L¹

1. Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP), Université d'Angers, Angers, France

2. Centre de Diagnostic et de Traitement de l'Ulcère de Buruli, Pobè, Bénin

3. Centre de Recherche pour la Gestion de la Biodiversité et du Terroir (CERGET), Cotonou, Bénin

4. Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

5. Institut National de Santé Publique (INSP), Abidjan, Côte d'Ivoire

Med Trop 2011 ; 71 : 169-172

RÉSUMÉ • Le rôle des punaises aquatiques comme hôte de *Mycobacterium ulcerans* est maintenant clairement établi et leur rôle comme vecteur a été démontré expérimentalement. Travaux confortés par le fait que récemment, des bacilles viables ont été détectés dans la salive de punaises aquatiques sauvages. Cependant, l'importance des punaises aquatiques dans l'écologie de *M. ulcerans* reste méconnue et difficile à explorer en raison du manque de connaissances sur la biologie de ces insectes. Dans cette étude et ce pour la première fois, des signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont été détectées dans les tissus de punaises aquatiques capturées en dehors de leur environnement aquatique. Cela supporte l'hypothèse selon laquelle, par leur comportement migratoire, les punaises aquatiques contribueraient à la dissémination du bacille ainsi qu'à sa transmission hors de l'environnement aquatique.

MOTS-CLÉS • *Mycobacterium ulcerans*. Punaises aquatiques. Dissémination. Transmission. Bénin.

DETECTION OF MYCOBACTERIUM ULCERANS DNA IN WATER BUGS COLLECTED OUTSIDE THE AQUATIC ENVIRONMENT IN BENIN

ABSTRACT • Hosting of *Mycobacterium ulcerans* by water bugs is now well established and their vectoring role has been demonstrated experimentally. These findings were recently corroborated by detection of viable bacilli in the saliva of wild water bugs. However, the extent of water bug involvement in *M. ulcerans* ecology remains unclear and difficult to evaluate due to lack of understanding about water bug biology. The purpose of this study is to describe the first detection of *M. ulcerans* DNA in the tissue of water bugs captured outside the aquatic environment. This finding supports the hypothesis that water bug migratory behavior contributes not only to the spread of *M. ulcerans* but also to transmission outside the aquatic environment.

KEY WORDS • *Mycobacterium ulcerans*. Water bugs. Dissemination. Transmission. Benin.

Mycobacterium ulcerans est l'agent responsable de l'ulcère de Buruli, une maladie considérée comme émergente par l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette maladie principalement cutanée sévit tout particulièrement dans les zones tropicales humides. Ainsi, même si quelques cas sont rapportés chaque année en Australie, en Amérique du sud et en Asie, l'Afrique de l'Ouest reste la région la plus touchée (1). Les lésions cutanées sont provoquées par une toxine, la mycolactone, principal facteur de virulence de *M. ulcerans* (2, 3). Lorsqu'elle est excrétée, la toxine se concentre dans la matrice extracellulaire des bacilles. Cette matrice joue un rôle important pour la colonisation des différents hôtes du bacille (4).

Malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques de ces dernières années, plusieurs questions fondamentales subsistent quant à l'écologie de *M. ulcerans* et à son mode de transmission. Cette méconnaissance retarde la mise en place de mesures préventives, voire protectrices (5). La transmission interhumaine du bacille n'a été qu'exceptionnellement suspectée. Les épidémies sont associées aux zones humides et aux bouleversements environnementaux (création de zones humides, déforestation, ...) (6-15). L'homme se contaminerait au contact de l'environnement aqua-

tique, probablement au cours d'activités telles que le lavage du linge ou de la vaisselle, la collecte de l'eau de boisson, l'agriculture ou le maraîchage. Selon les hypothèses les plus probables, l'eau serait le réservoir du germe et sa transmission se ferait par inoculation directe, par contact d'une plaie avec une eau souillée ou par l'intermédiaire d'un vecteur. En 1999, il a été suggéré que les punaises aquatiques joueraient un rôle dans la transmission du bacille (16) et seraient des hôtes spécifiques de *M. ulcerans*. Les mollusques (proies des punaises) seraient quant à eux des « hôtes intermédiaires » (4, 17-22). Enfin, des plantes aquatiques serviraient de support à la formation de biofilms, contaminant ainsi les mollusques qui les broutent (21-22). Des études environnementales ont permis de valider les données sur l'écologie et la transmission de *M. ulcerans* obtenues d'après le modèle expérimental (18-21). En 2008, le bacille a été, pour la première fois, isolé de l'environnement et ce, à partir d'une punaise d'eau (25). Cette étude confirme de façon indiscutable le rôle des punaises dans l'écologie et la transmission de *M. ulcerans*. Il avait été suggéré que les moustiques pouvaient avoir un rôle de vecteur, tout particulièrement en Australie, mais cette hypothèse vient d'être rejetée (26). Une étude réalisée au Cameroun a montré que l'utilisation de moustiquaires participait à la protection contre l'infection à *M. ulcerans* (12). Cette observation a suggéré pour la première fois que des insectes hors du contexte aquatique seraient des vecteurs du bacille.

• Correspondance : laurent.marsollier@inserm.fr

• Article reçu le 20/08/2010, définitivement accepté le 29/11/2010

Les punaises aquatiques étant capables de voler sur une dizaine de kilomètres de leur point d'eau, elles pourraient participer à la dissémination du bacille dans l'environnement mais également à sa transmission en dehors du milieu aquatique. Par recherche de signatures moléculaires, cette étude montre, pour la première fois, la présence de *M. ulcerans* dans les tissus de punaises aquatiques capturées lors de leur activité de migration (vol). Ces résultats confortent le rôle de ces insectes dans l'écologie et le mode de transmission de *M. ulcerans*.

Matériel et méthodes

Capture des punaises aquatiques dans le fleuve Ouémé (Bénin).

En octobre 2004, une campagne active de capture d'insectes aquatiques a été réalisée dans une zone hyper endémique pour l'ulcère de Buruli, le long du fleuve Ouémé sur cinq sites localisés entre Assrossa et Azowlissé (figure 1a). Les insectes ont été collectés dans la végétation aquatique à une profondeur comprise entre 0 et 0,5 m en utilisant une épuisette dont les mailles avaient un diamètre de 5 mm. En octobre 2007, de nombreuses punaises aquatiques attirées par les lumières des maisons de Pobè ont été observées durant plusieurs nuits. Trente cinq de ces spécimens ont été capturés dans une même maison. Tous les insectes ont été conservés dans de l'éthanol absolu pour identification et recherche de signatures moléculaires de *M. ulcerans*.

Identification des hémiptères aquatiques.

Les punaises aquatiques appartiennent au phylum des arthropodes, classe des insectes, ordre des hémiptères et sous-ordre des hétéroptères. Les deux principaux critères d'identification sont : (i) leurs pièces buccales qui sont de type piqueur suceur et sont contenues dans un rostre segmenté ; (ii) la présence de deux paires d'ailes chez les adultes. Pour nos travaux, nous avons utilisé l'unique classification des punaises aquatiques tropicales établie par Dethier (27) et le document réalisé par Tchiboza (28) qui ne permettent une identification que jusqu'au genre.

Détection des signatures moléculaires de *M. ulcerans* dans les tissus des punaises aquatiques.

Après broyage (chaque insecte a été traité individuellement), l'ADN a été extrait en utilisant la trousse MoBio Power Soil comme nous l'avons décrit précédemment (29). Par PCR quantitative, des signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont été recherchées dans l'ensemble des échantillons. Afin d'obtenir une bonne spécificité, deux séquences ont été recherchées : la séquence IS2404 et la séquence codant le domaine KR de la kétoreductase B de la polykétide synthase, enzyme impliquée dans la synthèse de la mycolactone (30). Un échantillon est alors considéré comme positif seulement si les 2 séquences testées sont détectées, avec une valeur seuil (Ct) inférieure à 35 cycles.

Relevés météorologiques.

Les données météorologiques (pluviométrie) ont été enregistrées à Cotonou et transmises par Météo France.

Résultats

Inventaire des punaises aquatiques présentes le long du fleuve Ouémé

En octobre 2004, correspondant à la fin de la saison des pluies, 347 punaises aquatiques ont été capturées dans cinq zones s'étendant sur 40 kilomètres le long du fleuve Ouémé (figure 1, a et b). Dans nos conditions de prélèvements les punaises aquatiques représentaient entre 10 et 60 % de l'ensemble des insectes capturés (figure 1b).

La famille des *Belostomatidae* est la famille la mieux représentée (73 % des punaises collectées) (figure 2a). Il a été possible de distinguer deux genres au sein de cette famille (*Belostoma cordofana* et *Diplonychus sp*). Trois espèces appartenant au genre *Diplonychus* (aussi nommé *Appasus*) ont été identifiées (*Diplonychus sp1* (figure 3), *Diplonychus sp2* et *Limnogeton fieberi*). Comme le montre la figure 2b, *Diplonychus sp1* était l'espèce la plus capturée (85 %). La recherche de signatures moléculaires de *M. ulcerans* a montré que toutes les familles et genres collectés pouvaient héberger le bacille quel que soit le site de prélèvement. Le taux de détection des signatures varie entre 8,2 et 12 % (toutes familles confondues). Dans cette étude ponctuelle, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence de familles de punaises qui seraient plus permissives que d'autres.

Détection des signatures moléculaires de *M. ulcerans* au sein des punaises aquatiques capturées hors de leur milieu aquatique

En fin de première semaine et au début de la deuxième semaine d'octobre 2007, de nombreuses punaises aquatiques ont été

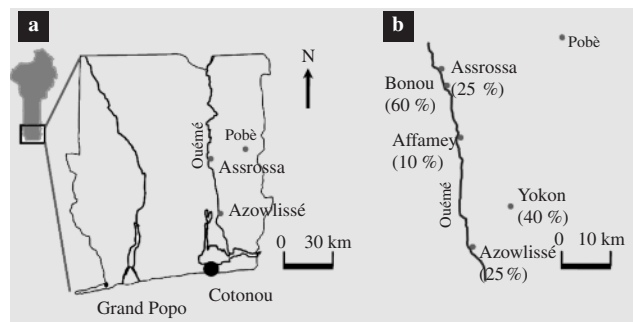


Figure 1. Localisation des sites de collecte pour l'inventaire des punaises aquatiques. (a) Carte du Bénin et élargissement de la zone au sud du pays où sont localisés les sites de collecte des insectes aquatiques le long du fleuve Ouémé localisés entre Assrossa et Azowlissé. (b) Localisation des cinq sites de collecte des insectes aquatiques en octobre 2004 (points rouges) et octobre 2007 (point vert). Les pourcentages des punaises aquatiques par rapport aux insectes totaux collectés sont indiqués pour chaque site.

observées la nuit (entre 20 h et 22 h) dans les églises et maisons où elles étaient attirées par la lumière. Pendant la journée, des insectes ont été retrouvés à l'abri de la lumière dans la literie et les placards. Ce phénomène, de par son ampleur, n'avait jamais été rapporté auparavant par les habitants. Trente-cinq spécimens ont été capturés au cours d'une soirée dans une même habitation à Pobè (figure 1, a et b). Les insectes capturés étaient tous des *Diplonychus sp1* (figure 3) et les signatures moléculaires de *M. ulcerans* ont été mises en évidence dans les tissus de trois de ces insectes (8,6 %).

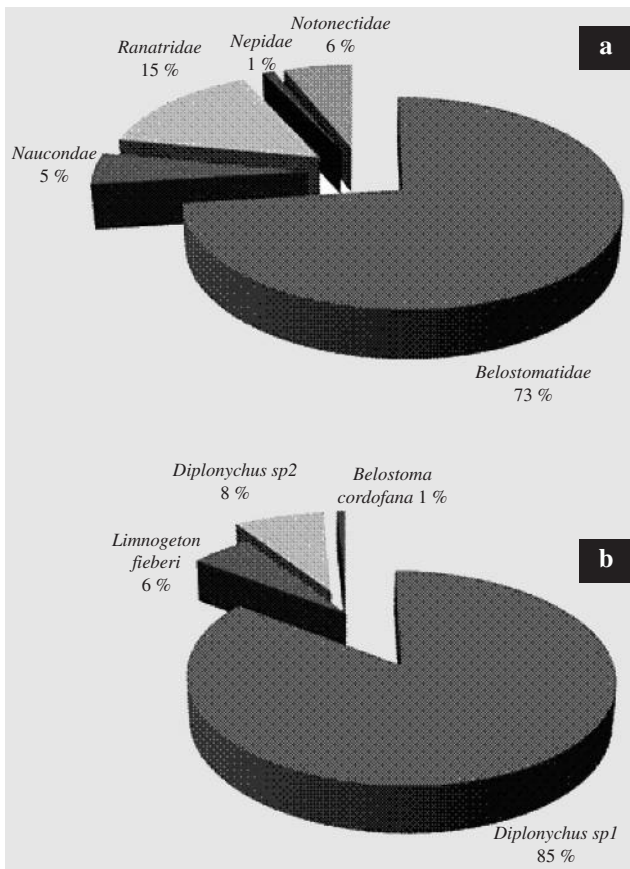


Figure 2. Inventaire des punaises aquatiques capturées. (a) Répartition des cinq familles de punaises aquatiques identifiées au cours de la collecte en octobre 2004 le long du fleuve sur les cinq sites sélectionnés (nombre total de spécimens : 347). La famille des Belostomatidae est la plus représentée. (b) Répartition des espèces de Belostomatidae identifiées. L'espèce *Diplonychus sp1* a été capturée le plus fréquemment (62,5 % des punaises aquatiques totaux).



Figure 3. *Dyplonychus sp1*. Photo de *Dyplonychus sp1*, l'espèce capturée en dehors de l'environnement aquatique lors de ses activités migratoires. Echelle : 0,3 cm.

La pluviométrie : facteur influençant la migration des punaises aquatiques ?

Lorsque ce phénomène de migration a été observé en octobre 2007, l'accumulation des pluies était exceptionnelle. En effet, les relevés pluviométriques des mois d'octobre précédents (de 2001 à 2006) montrent qu'en moyenne les précipitations s'élèvent à 150 mm alors que, en octobre 2007, elles étaient de 227 mm (soit une augmentation de 151,3 %). De plus, entre 2001 et 2006, les précipitations de la première semaine d'octobre ne représentaient que 10 % des précipitations totales du mois contre 50 % en 2007 (figure 4).

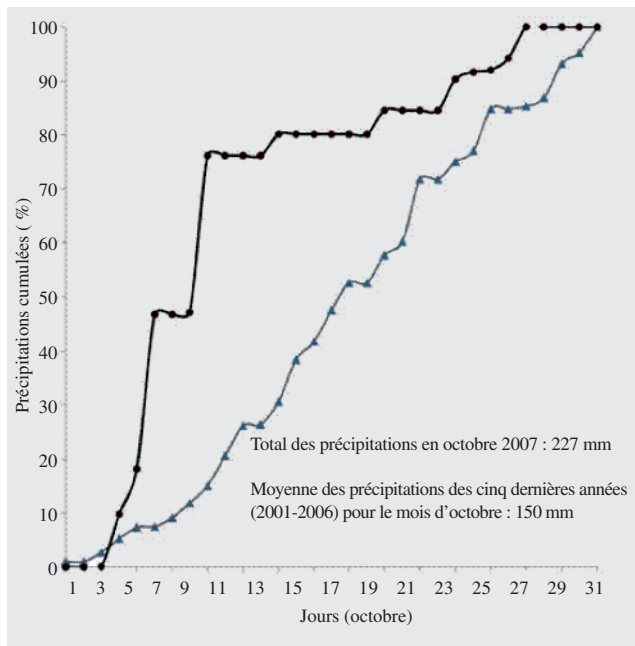


Figure 4. Courbes cumulatives des précipitations du mois d'octobre 2007 et de la moyenne cumulative des précipitations du mois d'octobre de cinq années (2001 à 2006) (données aimablement fournies par Météo France).

Discussion

L'écologie et le mode de transmission de *M. ulcerans* ne sont pas encore clairement établis. Cependant, le rôle des punaises aquatiques a été évoqué depuis 1999 (16) et des études expérimentales ont montré que *M. ulcerans* était capable de coloniser leurs glandes salivaires et d'être transmis à des souris après morsure (20). Cette propriété a été redémontrée récemment par une équipe américaine (31). De plus, très récemment, des bacilles viables ont été détectés dans la salive de punaises capturées dans l'environnement (29), renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle ces insectes sont capables de transmettre le bacille par piqûre. Du fait du manque de connaissances concernant ces insectes (biodiversité, écologie...), l'importance de leur rôle *in natura* dans la transmission et l'écologie de *M. ulcerans* reste difficile à évaluer. Une étude récente a montré qu'il existait des variations spatio-temporelles en termes de nombre d'individus mais aussi en termes de taux de colonisation des punaises par *M. ulcerans* en zone endémique à l'ulcère de Buruli (29). Par exemple, le taux de colonisation des punaises aquatiques était plus élevé en juillet, période où le niveau de l'eau est le plus important. Il y aurait donc dans l'environnement des périodes plus favorables à la multiplication de *M. ulcerans* et/ou au développement des punaises aquatiques, donc des risques saisonniers d'exposition à *M. ulcerans* pour les populations. Des variations saisonnières des cas d'ulcère de Buruli ont déjà été rapportées dans plusieurs études, notamment en Ouganda, où un nombre moins important de cas a été observé à la fin de la saison sèche, ou bien en Australie, où la majorité des cas a été enregistré en automne et en hiver (32-33). Puisque le délai de développement des lésions est variable et que les patients tardent à consulter, les risques associés à de telles variations demeurent difficiles à définir.

Dans la présente étude, des signatures moléculaires du bacille ont été détectées dans les tissus de punaises aquatiques capturées en dehors du milieu aquatique, lors de leur activité migratoire

(vol). Cette observation soutient l'hypothèse selon laquelle les punaises aquatiques joueraient un rôle dans la dissémination du bacille mais également dans la transmission du bacille en dehors du milieu aquatique. Les connaissances actuelles ne nous permettent pas d'identifier les facteurs influençant la migration (le vol) de ces insectes. Néanmoins, différents paramètres sont suspectés : la densité de proie, la période de reproduction, la phase lunaire et la température (34-37). La corrélation entre les précipitations et l'activité de vol a été rapportée pour les *Belostomatidae* lors d'une étude réalisée en zone tropicale au Costa Rica (37, 38). Notre étude nous autorise à penser que les pluies importantes, enregistrées au moment de la capture en 2007, ont fortement perturbé le milieu aquatique en termes de qualité de l'eau, destruction de l'habitat et « dilution » de proies obligeant les punaises à rechercher des lieux qui leur sont plus favorables.

Cette nouvelle étude vient ainsi apporter un argument supplémentaire en faveur du rôle des punaises aquatiques dans l'écologie de *M. ulcerans* et renforce la possibilité de variations saisonnières dans la transmission de la bactérie à l'homme, liées à des facteurs environnementaux.

Remerciements • Ce travail a reçu le soutien de la Fondation Raoul Follereau, de l'IMEA, de l'Inserm, de la Région Pays de la Loire, Angers Loire métropole et du Conseil général de Maine-et-Loire.

Références

- No authors listed. Buruli Ulcer: progress report, 2004-2008. *Wkly Epidemiol Rec* 2008; 83 : 145-54.
- George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, et al. Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science*. 1999; 283 : 854-7.
- George KM, Pascopella L, Welty DM, Small PL. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 2000; 68 : 877-83.
- Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog* 2007; 3 : e62.
- Johnson PD, Stinear T, Small PL, Pluschke G, Merritt RW, Portaels F, et al. Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med* 2005; 2 : e108.
- Aiga H, Amano T, Cairncross S, Adomako J, Nanas OK, Coleman S. Assessing water-related risk factors for Buruli ulcer: a case-control study in Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 : 387-92.
- Darje H, Le Guyadee T, Touze JE. Aspects épidémiologiques et cliniques de l'ulcère de Buruli en côte d'Ivoire : à propos de 124 observations récentes. *Bull Soc Pathol Exot* 1993; 86 : 272-6.
- Debacker M, Portaels F, Aguiar JR, Zinsou C, Zinsou C, Meyers W, et al. Risk factors for Buruli ulcer, Benin. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 : 1325-31.
- Johnson PD, Veitch MG, Flood PE, Hayman JA. *Mycobacterium ulcerans* infection on Phillip Island, Victoria. *Med J Aust* 1995; 162 : 221-2.
- Marston BJ, Diallo MO, Horsburgh CR, Jr, Diomande I, Saki MZ, Kanga JM, et al. Emergence of Buruli ulcer disease in the Daloa region of Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52 : 219-24.
- Nackers F, Johnson RC, Glynn JR, Zinsou C, Tonglet R, Portaels F. Environmental and health-related risk factors for *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli Ulcer) in Benin. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77 : 834-6.
- Pouillot R, Matias G, Wondje CM, Portaels F, Valin N, Ngos F, et al. Risk factors for buruli ulcer: a case control study in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1 : e101.
- Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor TH, Jr, Amofah GK, et al. Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana. *Clin Infect Dis* 2005; 40 : 1445-53.
- Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63 : 4135-8.
- Brou T, Broutin H, Elguero E, Asse H, Guegan JF. Landscape diversity related to Buruli ulcer disease in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2 : e271.
- Portaels F, Elsen P, Guimaraes-Peres A, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in the transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet* 1999; 353 : 986.
- Marsollier L, Andre JP, Frigui W, Reyssat G, Milon G, Carbonnelle B, et al. Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. *Cell Microbiol* 2007; 9 : 347-55.
- Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, Andre JP, Small PL, Milon G, et al. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol* 2005; 7 : 935-43.
- Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, Saint-Andre JP, et al. Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med* 2007; 4 : e64.
- Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint Andre JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 : 4623-8.
- Marsollier L, Sévérin T, Aubry J, Merritt RW, Saint Andre JP, Legras P, et al. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 : 6296-8.
- Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint Andre JP, Robert R, Legras P, et al. Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by *Mycobacterium ulcerans* in axenic culture and harbor these bacteria in the environment. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 : 1097-103.
- Johnson PD, Aзуolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, Hayman JA, et al. *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 : 1653-60.
- Quek TY, Athan E, Henry MJ, Pasco JA, Redden-Hoare J, Hughes A, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, southeastern Australia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 : 1661-6.
- Portaels F, Meyers WM, Ablordey A, Castro AG, Chemlal K, de Rijk P, et al. First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2 : e178.
- Wallace JR, Gordon MC, Hartsell L, Mosi L, Benbow ME, Merritt RW, et al. Interaction of *Mycobacterium ulcerans* with mosquito species: implications for transmission and trophic relationships. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76 : 6215-22.
- Dethier M. Introduction à la morphologie, la biologie et la classification des Héétérotères. *Bull Romand Ent* 1981; 1 : 11-6.
- Tchibozo S, Marsollier L, Heckman CW, Aubry J, Chaury A. Preliminary note on some aquatic insects in the Ouémé valley. *Trop Freshwater Biol* 2005; 14 : 1-7.
- Marion E, Eyangoh S, Yeramian E, Doannio J, Landier J, Aubry J, et al. Seasonal and regional dynamics of *M. ulcerans* transmission in environmental context: deciphering the role of water bugs as hosts and vectors. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4 : e731.
- Fyfe JA, Lavender CJ, Johnson PD, Globan M, Sievers A, Aзуolas J, et al. Development and application of two multiplex real-time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73 : 4733-40.
- Mosi L, Williamson H, Wallace JR, Merritt RW, Small PL. Persistent association of *Mycobacterium ulcerans* with the West African predeceous insects of the family belostomatidae. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 : 7036-42.
- Hayman J. Clinical features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Australas J Dermatol* 1985; 26 : 67-73.
- Revill WD, Barker DJ. Seasonal distribution of mycobacterial skin ulcers. *Br J Prev Soc Med* 1972; 26 : 23-7.
- Bowden J. The relation of activity of two species of *Belostomatidae* to rainfall and moonlight in Ghana (*Hemiptera* : *Heteroptera*). *J Ent Soc Sth Afr* 1964; 26 : 293-301.
- Cullen MJ. The biology of giant water bugs (*Hemiptera* : *Belostomatidae*) in Trinidad. *Proc R Ent Soc Lond* 1969; 44 : 123-6.
- Kopp K, Wachlewski M, Eterovick PC. Environmental complexity reduces tadpole predation by water bugs. *Can J Zool* 2006; 84 : 136-40.
- Robertson IAD. Records of insects taken at light traps in Tanzania. II Distribution and seasonal change in catches of *Belostomatidae* (*Hemiptera* : *Heteroptera*) in relation to rainfall. Center for Overseas Pest Research London. 1976
- Stout JR. Effects of harsh environment on the life history patterns of two species of tropical aquatic Hemiptera (Famili : *Naucoridae*). *Ecology* 1982; 63 : 75-83.