

Fiche bactériologique : diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*

1 - Nature des biopsies :

Il est recommandé d'envoyer au laboratoire de Bactériologie au minimum 2 biopsies antrales et 2 biopsies fundiques.

2-Transport des biopsies :

- Si le délai de transport est compris entre 2h et 4h maximum, transport à température ambiante dans du sérum physiologique ;
- si le délai est supérieur à 4h, congélation à -80°C dans un tube sec ;

Alternative : insérer au bloc une ou plusieurs biopsies dans un milieu de transport gélosé Portagerm Pylori (bioMérieux) ou sérum physiologique. Transport à +4°C 24h maximum dans un emballage envoi réfrigéré.

3 - Examen direct :

Un examen direct ne pourra être réalisé que si au minimum 2 biopsies par site sont envoyées. Cependant si une seule biopsie est disponible mais de taille suffisante, en découper une partie à l'aide d'un scalpel stérile.

L'examen direct sera réalisé par écrasement direct (type frottis) de la biopsie sur lame. Après séchage et coloration de Gram, regarder la lame à l'objectif 100X à immersion. Prendre bien soin de repérer les bacilles à Gram négatif spiralés ou incurvés qui peuvent se trouver répartis de manière très hétérogène, le plus souvent regroupés à proximité des cellules épithéliales dans les traînées de mucus.

4 - Prétraitement des biopsies :

Une étape de broyage est absolument nécessaire. La biopsie peut être broyée dans 1 mL d'un bouillon nutritif à l'aide d'un broyeur mécanique ou manuel (jetable ou non type Potter).

5 - Milieux de culture recommandés :

- Milieu commercialisé : gélose Pylori bioMérieux. *Avantages* : prêt à l'emploi ; conservation à +4°C jusqu'à date de péremption. *Inconvénient* : le milieu ne permet pas la culture de tous les isolats.

- Milieu à préparer au laboratoire : gélose Skirrow (base Columbia, supplément de Skirrow + sang de mouton) ; gélose utilisée par le CNR des Hélicobacters (Base Wilkins Chalgren, Vancomycine 10µg/mL, Amphotéricine B 10µg/mL, Cefsulodine 10µg/mL, Triméthoprim 5µg/mL + 10% sang humain). *Avantage* : Bonne sélectivité. *Inconvénients* : contrôler la qualité des milieux, péremption de 1 à 2 semaines maximum.

6 - Ensemencement et incubation :

Ensemencer le ou les milieux de culture à l'aide de 4 gouttes du broyat réalisé.

Etaler ces gouttes au centre de la gélose à l'aide d'une pipette pasteur sur une surface d'environ 3 cm de circonférence.

Incuber les géloses en atmosphère microaérobie (sachets microaérobie, jarre ou enceintes d'incubation) à 37°C. Les géloses ne seront regardées qu'au bout de 3 à 4 jours d'incubation. Les colonies sont petites, brillantes et sur milieu au sang non hémolytiques.

En l'absence de culture positive ré-incuber les géloses pendant au minimum 10 jours (tout en les regardant tous les jours ou tous les 2 jours). Pour cela les sachets sont très pratiques car ils permettent de visualiser les colonies par transparence.

7 - Identification et antibiogramme :

Sur des colonies suspectes, réaliser un état frais, une coloration de Gram, une recherche d'oxydase, de catalase et d'une activité uréasique (bouillon urée-indole). *H. pylori* est en effet un bacille mobile, incurvé, oxydase et catalase positif et avec une très forte activité uréasique.

Pour obtenir un inoculum bactérien suffisant à la réalisation d'un antibiogramme, reprendre les colonies dans 0,5 à 1 mL d'un bouillon nutritif. Ensemencer cette solution en nappe sur plusieurs géloses adaptées et incuber en atmosphère microaérobie.

Remarque : à cette étape de subculture *H. pylori* pousse en 24-48h. Une incubation prolongée des subcultures génère des formes dites « coccoïdes » rapidement non viables.

L'antibiogramme de *H. pylori* sera réalisé selon les recommandations du CASFM : soit inoculum 3 McF, inondation sur MH à 10% de sang de cheval, incubation 48-72H à 37°C en microaérobie.

Liste principale: lévofloxacine, clarithromycine, et tétracycline : CMI à interpréter à l'aide des concentrations critiques de l'EUCAST.

En l'absence de Etest, la détermination de la sensibilité aux macrolides et à la tétracycline peut être réalisée par diffusion en milieu gélosé (utiliser un disque d'érythromycine).

Liste complémentaire : amoxicilline, métronidazole, rifampicine.

Il n'existe virtuellement pas de souche résistante à l'amoxicilline.

Il n'existe aucune méthode parfaitement fiable pour déterminer la sensibilité au métronidazole. La présence d'une résistance ne sera pas un critère décisionnel d'utilisation de cette molécule pour traiter l'infection

Dans des cas particuliers, la sensibilité à la rifampicine peut être déterminée (Etest ou disque).

Antibiotiques	CMI critique mg/L(R si >) ^{\$}	Diamètres critiques
Clarithromycine	0,5	S ≥22, R<17mm*
Lévofloxacine	1	
Tétracycline	1	
Amoxicilline	0,12	
Métronidazole	8	
Rifampicine	1	

^{\$}selon les recommandations de EUCAST

*disque d'érythromycine 15UI

8 – Congélation :

Les isolats de *H. pylori* peuvent se conserver à -80°C dans un bouillon nutritif additionné de 10% de glycérol. Bien prendre soin de congeler des bactéries sous formes bacillaires et non des formes coccoïdes qui ne donneront pas de subculture à la décongélation.

Le reste du broyat de biopsies peut être directement congelé afin de réaliser si possible une détection moléculaire de *H. pylori* et de la présence de mutations associées à la résistance aux macrolides et éventuellement aux fluoroquinolones.