

Fiche Bactériologique : diagnostic par culture à partir de biopsies gastriques

Christophe Burucoa¹, Philippe Lehours², Sabine Trombert³, Emilie Bessède², Francis Mégraud², Josette Raymond⁴

¹Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU de Poitiers, ²Laboratoire de Bactériologie, CNR des Campylobacters et des Helicobacters, CHU Pellegrin, Bordeaux, ³ Laboratoire Cerba, ⁴ Laboratoire de Bactériologie, CHU Cochin APHP, Paris.

1. Contexte

Le diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* par culture à partir de biopsies gastriques est la méthode diagnostique la plus spécifique, c'est la seule qui permet de déterminer la sensibilité de la bactérie à tous les antibiotiques utilisés pour l'éradication de la bactérie. Elle est délicate et l'objectif de cette fiche est de favoriser la diffusion de cette technique au plus grand nombre de laboratoires. Les recommandations internationales, européennes et nationales privilégient maintenant un traitement de première intention orienté par les résultats de l'antibiogramme ou de la PCR. La culture est donc, avec la PCR, la méthode qui doit être disponible dans l'ensemble des laboratoires du territoire. Sa sensibilité peut atteindre 97% si les étapes pré-analytiques et analytiques sont optimales.

2. Objectifs

Décrire la technique permettant d'isoler *H. pylori* en culture à partir de biopsies gastriques et de déterminer sa sensibilité aux antibiotiques.

3. Description

3.1 Pré-analytique :

Un arrêt de 4 semaines des antibiotiques et de deux semaines des inhibiteurs de la pompe à proton est un pré-requis à la réalisation de biopsies à visée bactériologique.

3.1.1 Transport

Il est recommandé dans l'idéal d'envoyer au laboratoire 1 biopsie antrale et 1 biopsie fundique. Plus le nombre de biopsies est élevé plus la détection de la bactérie et surtout la détection de bactéries résistantes est performante. Les infections multiples (plusieurs souches génétiquement différentes) ou mixtes (la même souche mais avec sous clones sensible et résistant) dans la même biopsie sont possibles.

Les conditions de transport des biopsies gastriques sont critiques pour la bonne sensibilité de la technique. Les échantillons doivent être adressés rapidement au laboratoire en utilisant selon le délai :

- Si le délai est inférieur à 48h : transport en milieu Portagerm pylori (bioMérieux réf. 42 041). Bien contrôler la péremption courte des milieux (3 mois), à conserver à 4°C. Laisser le flacon revenir à température ambiante avant d'introduire une ou plusieurs biopsies en profondeur dans la gélose. Si le transport est inférieur à 24h un transport à température ambiante est possible, l'idéal étant cependant d'assurer un transport à +4°C ce qui peut autoriser 48h de délai.

- Si le délai est supérieur à 48h : congélation du Portagerm à -20°C ou -80°C. Le transport en carboglace ou azote liquide en tube sec est à réserver pour le transport de biopsies gastriques sans Portagerm.

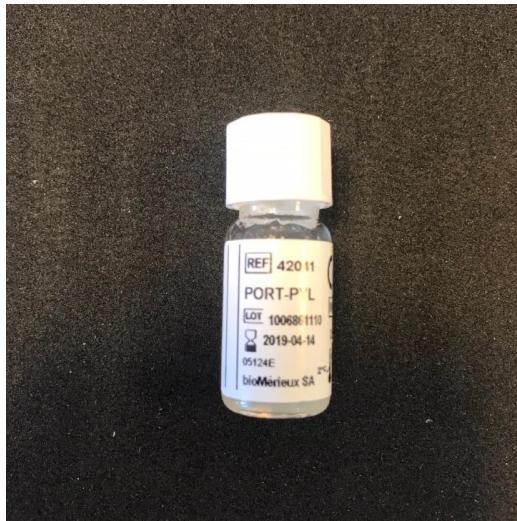


Figure 1. Tube de transport PORT-PYL : Portagerm pylori, bioMérieux

3.1.2 Broyage

La distribution des *Helicobacter* dans la muqueuse gastrique est hétérogène et en amas, le broyage permet une homogénéisation du matériel permettant de comparer les résultats de l'examen direct, de la culture et de la PCR, il dissocie les amas favorisant la détection. Plusieurs techniques de broyage sont disponibles :

- Broyage à l'aide d'un broyeur à bille (MM400 Retsch). Transférer les biopsies dans un microtube stérile sécurisé à fond plat contenant deux billes inox 4mm et 1 ml de sérum physiologique. Installer les tubes sur le broyeur dans l'adaptateur à microtubes, 1min30, fréquence 20/sec
- Broyage à l'aide d'un pilon usage unique stérile (VWR réf. 47747-366 ou LABCON réf. 2912-820-000) en microtube 1,5 ml stérile dans quelques gouttes de bouillon nutritif (Bouillon Brucella ou BHI). On peut aussi utiliser un broyeur réutilisable type Potter à nettoyer et stériliser pour chaque usage. Broyer pendant 10 sec minimum. La suspension doit être homogène. Compléter la suspension avec du bouillon nutritif jusqu'à 1 ml.

Le produit de broyage est utilisé à part égale pour l'examen direct, la mise en culture, la PCR et la congélation. Le dépistage d'une activité uréasique sur le produit de broyage ne présente pas une bonne sensibilité de détection de l'infection, il utilise un volume de biopsie qu'il vaut mieux destiner à la culture et surtout à la PCR, bien plus contributives au diagnostic.

3.2 Examen microscopique

Déposer une goutte du broyat sur une lame porte-objet correctement identifiée. A l'aide d'une seconde lame, étaler la goutte de broyat afin d'obtenir un frottis fin et régulier. Lorsque le frottis est sec, effectuer une coloration de Gram.

Observer au microscope objectif 100 (grossissement X1000) à immersion la présence de bactéries à Gram négatif ayant une morphologie caractéristique : spiralée ou incurvée.

La répartition peut être très hétérogène. Estimer de manière semi-quantitative la densité de bactéries spiralées. Noter la présence éventuelle de bactéries très spiralées en tire-bouchon, caractéristique d'*Helicobacter non pylori* non cultivables en conditions standards. L'examen direct prend du temps, sa sensibilité est mauvaise (60-80%) mais il est économique et rapide et permet de détecter les infections à *Helicobacter non pylori* pour lesquelles la culture et la PCR seront négatives.

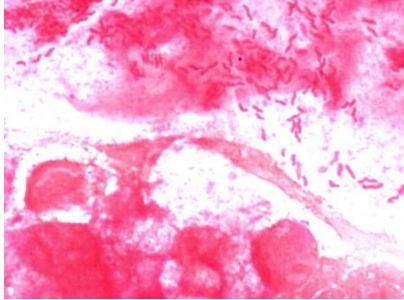


Figure 2. Aspect en coloration de Gram de *Helicobacter suis* : bacilles longs, incurvés, très spiralés

3.3 Mise en culture

3.3.1 Milieux de culture recommandés

- Milieu commercialisé : gélose Pylori bioMérieux, *Helicobacter* agar, modified Becton Dickinson. Avantages : prêt à l'emploi, conservation à 4°C, contrôler la péremption.
- Milieu à préparer au laboratoire : gélose Skirrow (base Columbia, supplément de Skirrow (Oxoid) + sang de mouton ou cheval 10%) ou la gélose du CNRCH (base Wilkins Chalgren, Vancomycine 10µg/L, Amphotéricine B 10µg/L, Cefsulodine 10µg/L, Triméthoprime 5µg/L, 10% sang humain). Avantage : bonne sélectivité. Inconvénient : contrôler la qualité des milieux à chaque lot, péremption courte (14 jours).

3.3.2 Ensemencement

Déposer 3 à 4 gouttes de broyat au centre de la boîte (ou des boîtes si 2 milieux différents), étaler en étoile ou en petite nappe sans toucher les bords (évite les contaminations). Incuber en jarre, en atmosphère microaérobie (sachets générateurs) à 35°C. Des sachets permettant la génération d'une atmosphère microaérobie peuvent également être utilisés mais pas plus de deux géloses par sachet et à condition de renouveler l'atmosphère toute les 48h.



Figure 3. Ensemencement

3.3.3 Lecture des boîtes

Les boîtes de cultures ne seront examinées qu'au 2^{ème} ou 3^{ème} jour d'incubation, puis tous les 2 jours. Ce n'est qu'au 12^{ème} jour d'incubation sans colonie suspecte visible que la culture est considérée comme négative. Les colonies sont petites, brillantes et non hémolytiques.

3.3 Identification

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

La spectrométrie de masse, dans les conditions standard, ne permet pas l'identification de *H. pylori*.

3.4 Subcultures

L'obtention de subculture en quantité suffisante pour la réalisation de l'antibiogramme et la congélation des souches isolées est une étape délicate. *H. pylori* est une bactérie de croissance fastidieuse qui a très vite tendance à se transformer, passant en quelques heures de culture de sa forme spiralée cultivable à une forme coccoïde non cultivable. La forme coccoïde est facilement identifiable à l'état frais ou au Gram par sa forme ronde et immobile. Il est nécessaire à chaque repiquage de vérifier que l'inoculum qu'on vient de préparer contient moins de 10% de formes coccoïdes. Il ne faut pas attendre d'avoir sur les boîtes de primo culture de « belles colonies », la transformation coccoïde est déjà largement enclenchée et la subculture sera négative. De même ne pas laisser trainer trop longtemps sur la paillasse les boîtes de primo-culture, l'aérobiose est un facteur déclenchant la transformation coccoïde. La culture en nappe favorise une croissance rapide (24-48h) mais aussi la transformation coccoïde qui sera définitive en 3-4j. Pour faire passer le week-end à une culture et récupérer le lundi des bactéries cultivables, il est utile de repiquer en quadrants, la culture sera plus lente et la transformation coccoïde retardée. On peut aussi conserver à 4°C en microaérobiose une boîte de culture de 48h.

Pour obtenir un inoculum bactérien suffisant à la réalisation d'un antibiogramme, reprendre à l'écouvillon les colonies de la primo-culture dans 0,5 à 1 mL de bouillon nutritif. Ensemencer cette suspension en nappe sur 3 géloses adaptées et incuber à 37°C en atmosphère microaérobie.

3.4 AntibioGramme

L'antibiogramme sera réalisé selon les recommandations du CA-SFM : inoculum standardisé à 3 McFd (dans 2-4 mL de bouillon Brucella ou de bouillon nutritif), vérifier à l'état frais ou au Gram l'absence de formes coccoïdes), inondation sur MH à 10% de sang de cheval, incubation 48-72h à 37°C en microaérobiose. Le milieu MHF proposé par le CASFM ne permet pas la pousse suffisante de tous les isolats (données du CNRCH). Certains laboratoires experts utilisent la gélose Schaedler+hémimine+vitK1 (exemple : ref PB5034A, Oxoid): les résultats sont concordants avec la gélose MH10% (données du CNRCH et du CNR *Helicobacter* Belge).

Éliminer l'excès de suspension, mettre les boîtes à sécher sous la hotte environ 10 minutes. Déposer à l'aide d'une pince stérile au centre des boîtes le E-tests (sortir les E-test 30 minutes avant utilisation du congélateur ou 10 minutes du réfrigérateur).

Liste principale : clarithromycine et lévofloxacine : CMI à interpréter avec les concentrations critiques ci-dessous. Une double lecture est parfois nécessaire, surtout si les zones d'inhibition ne sont pas nettes.

Liste complémentaire : amoxicilline, tétracycline, métronidazole, rifampicine. Ces antibiotiques ne sont pas conseillés en première ligne de test. Les souches résistantes à l'amoxicilline sont rarissimes (vérifier que l'on teste bien un *H. pylori*). La détermination de la sensibilité au métronidazole n'est pas fiable quelle que soit la méthode (peu reproductible) et la détection d'une résistance peut ne pas impacter l'efficacité d'un traitement comprenant du métronidazole. La rifampicine est testée et c'est la rifabutine qui peut être utilisée en traitement d'éradication. Elle ne doit être utilisée qu'en dernier recours et préservée pour ne pas risquer de développer de résistance chez d'autres bactéries pour lesquelles elle constitue un traitement de première ligne (tuberculose...).

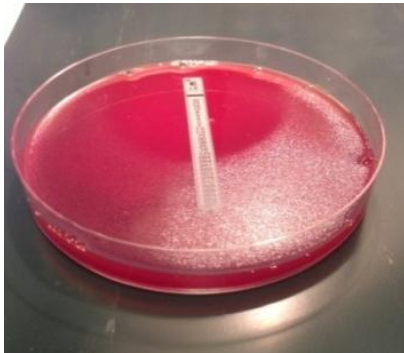


Figure 4. E-test lévofloxacine, CMI 0,064 mg/L : Sensible

Tableau 1. Concentrations critiques pour interprétation des CMI de *H. pylori*

Antibiotiques	Concentrations critiques en mg/L
Clarithromycine	0,5
Lévofloxacine	1
Tétracycline	1
Amoxicilline	0,12
Métronidazole	8
Rifampicine	4

3.5 Conservation

Les isolats de *H. pylori* ne peuvent se conserver que congelés à -80°C en bouillon nutritif glycérolé (25%). Les cryobilles ne conviennent pas. Bien contrôler l'absence de forme coccoïde dans l'inoculum avant la congélation. Faire une suspension riche. Il peut être utile de congeler aussi une partie du broyat des biopsies pour des contrôle en cas de discordance culture/PCR/examen direct.