

Culture de *Helicobacter pylori* à partir des biopsies gastriques

Les conditions de transport des biopsies gastriques sont strictes pour pouvoir rechercher *H. pylori* par culture. Les échantillons doivent être adressés rapidement au laboratoire en utilisant un milieu de transport spécifique à +4°C (par exemple milieu Portagerm Pylori, bioMérieux). Au-delà de 24 h de transport, il est préférable décongeler les biopsies dans un tube sec et les acheminer en carboglace ou en azote liquide.

I. Ensemencement des biopsies gastriques

Matériels nécessaires

- milieux de culture gélosés « Pylo CNRCH » (contacter le CNR pour composition et préparation) ;
ET/OU un milieu de culture Pylori commercial (bioMérieux réf 413193). Ces milieux sont à sortir du réfrigérateur 30 min avant utilisation ;
- du bouillon nutritif, par exemple bouillon Brucella ou BHI ;
- pilons en plastique stériles (VWR réf 47747-366 ou LABCON réf 2912-820-000) et tubes 1,5 ml stériles ;
- Oeses stériles ;
- Pastettes stériles.

I.1 Broyage

Ajouter à l'aide d'une pastette quelques gouttes de bouillon nutritif dans le tube stérile de 1,5 ml. Prélever le ou les fragments de biopsie avec une oese ou une pastette stérile et les déposer dans le microtube.

Broyer la biopsie à l'aide du pilon pendant 10 sec maximum. La suspension doit être homogène. Compléter la suspension avec du bouillon nutritif jusqu'à un volume d'environ 1ml.

I.2 Examen direct

Un examen direct peut être effectué directement sur les biopsies gastriques.

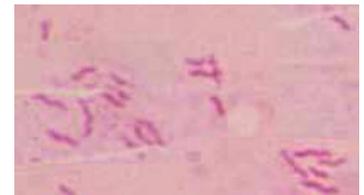
Pour cela, déposer un des fragments de biopsie ou une goutte du broyat sur une lame porte objet correctement annotée. A l'aide d'une seconde lame, écraser la biopsie ou étaler la goutte de broyat afin d'obtenir un frottis fin et régulier. Lorsque le frottis est sec, effectuer une coloration de Gram.

Lecture et interprétation de l'examen direct :

Observer au microscope au grossissement X100 la présence éventuelle de bactéries ayant une morphologie correspondant à celle d'un *Helicobacter sp.* : un bacille à Gram négatif de forme spiralée ou incurvée.

Faire une estimation quantitative du résultat :

0 = négatif + = Rare ++ = quelques +++ = nombreux



I.3 Ensemencement des biopsies gastriques

A partir du broyat ainsi obtenu, déposer 2 ou 3 gouttes de suspension au centre de 1 ou 2 milieux de culture sélectifs (gélose « Pylo CNRCH » et/ou gélose pylori bioMérieux) et réaliser un isolement en étoile sans toucher les bords de la boîte (pour éviter les contaminations).

Chaque milieu de culture est incubé sous atmosphère microaérobie dans une enceinte à 37°C. Si les milieux sont incubés en jarre, la mise en atmosphère est réalisée à l'aide d'un Anoxomat. Des sachets permettant la génération d'une atmosphère microaérobie peuvent être également utilisés (pas plus de 1 gélose par sachet) à condition de renouveler l'atmosphère toutes les 48h-72h.

Le reste du broyat est stocké au congélateur à -20°C en vue de la réalisation d'une détection par PCR en temps réel.

Culture de *Helicobacter pylori* à partir des biopsies gastriques

II. Culture des isolats obtenus à partir de biopsie ou culture d'une souche de *H. pylori*

Regarder et rechercher la présence de colonies toutes les 48h après ensemencement de la biopsie sur les milieux Pylo. Les colonies caractéristiques de *Helicobacter pylori* sont petites, brillantes, rondes et bombées (0,5 à 1 mm de diamètre).

Toujours effectuer un état frais avant d'effectuer un repiquage :

-à l'aide d'une pastette, déposer une petite goutte de sérum physiologique au centre d'une lame préalablement annotée. Prélever quelques colonies avec une oese stérile et réaliser une suspension bactérienne dans la goutte, recouvrir ensuite rapidement la goutte d'une lamelle couvre-objet.

Lecture et interprétation :

La préparation est examinée au grossissement X40 ou X100 avec de l'huile, condensateur au minimum et diaphragme légèrement ouvert. .

Vérifier que la morphologie correspond à celle d'un *Helicobacter pylori* : bacille spiralé ou incurvé et mobile.

Sur les colonies caractéristiques et après état frais, réaliser des repiquages en spot ou en cadran sur des géloses Pylo « maison » ou commerciales et conserver la boîte contenant le reste de la subculture étudiée à 4°C sous atmosphère microaérobie (utile en cas de problème à la lecture subcultures). Si la pousse est suffisante, ensemercer 5 boîtes : 1 ou 2 pour réaliser les antibiogrammes, le reste pour les congélations.

Repiquage en spot :

A l'aide d'une pastette, déposer 1 goutte de bouillon Brucella aux quatre coins de chaque milieu. Dans chaque goutte, déposer 1 colonie prélevée à l'aide d'une oese stérile à pointe fine. Incuber les boîtes pendant 48H à 37°C en atmosphère microaérobie.

Repiquage en cadran :

Avec une pastette, déposer 2-3 gouttes de Brucella dans le premier 1/3 cadran de la boîte. A l'aide d'une oese stérile, prélever des colonies, les étaler en nappe dans 1/3 de la boîte puis réaliser 2 cadrans et isoler au niveau du 3^{ème}.

Après 48H d'incubation, réaliser des tests biochimiques (voir paragraphe suivant) sur les spots ou isollements obtenus pour confirmer l'identification de *Helicobacter pylori*.

Après incubation, 1 à 2 gélose Pylo « maison » ou Pylori bioMérieux serviront à réaliser les suspensions nécessaires aux antibiogrammes, et les 2-3 autres serviront pour réaliser les tubes de congélation.

Une culture négative est rendue **après 12 jours d'incubation** à 37°C et sous atmosphère microaérobie.

III. Analyse et conservation des souches pures de *Helicobacter pylori*

III.1 Tests biochimiques

Les tests suivants sont à réaliser pour confirmer la présence de *Helicobacter pylori*.

III.1.a Test oxydase

A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever quelques colonies de la souche à tester et les déposer sur une membrane «BD BBL™ Dryslide™» (réf 231749) ou tout autre réactif commercial adapté. Un virage coloré rapide au violet indique une réaction positive.

III.1.b Détection de la catalase

Déposer une goutte d'eau oxygénée à 30 volumes sur une lame. A l'aide d'une oese stérile, prélever quelques colonies de la souche à tester et les déposer dans la goutte d'eau oxygénée. L'apparition de nombreuses bulles indique une réaction positive.

Culture de *Helicobacter pylori* à partir des biopsies gastriques

III.1.c Test à l'urée

Déposer une goutte de milieu Urée-Indole sur une lame. A l'aide d'une oese stérile, prélever quelques colonies de la souche à tester et les déposer dans la goutte. Un virage coloré rapide (≤ 1 min) au rose fuchsia indique une réaction positive.

III.2 Réalisation de l'antibiogramme

Matériels nécessaires

- Milieu de culture MH 10% maison (base Mueller Hinton + 10% de sang de mouton ou cheval) OU milieu de culture commercial MH-F ;
- Lecteur de Densité Optique ;
- Tube en verre contenant 4 ml de bouillon Brucella ;
- Oeses stériles ;
- Bandelettes E-tests : en systématique : CH Clarithromycine, LVX Lévofoxacine ; en complément si nécessaire : RI Rifampicine, TE Tétracycline ;
- Pince stérile.

Préparer une suspension bactérienne de 3 McF de la souche à tester dans 4mL de bouillon Brucella ou de bouillon nutritif. Il est important de vérifier l'absence de formes cocoïdes dans la suspension : un état frais + éventuellement une coloration de Gram suffisent pour s'en assurer. A l'aide de cette suspension, inonder géloses MH ou MHF. Eliminer l'excès de suspension et mettre les boîtes à sécher sous la hotte environ 10 minutes.

Une fois les boîtes sèches, déposer à l'aide d'une pince stérile au centre des boîtes les E-test à tester (sortir les E-test 30 min avant utilisation du congélateur ou 10 min du réfrigérateur).

Faire un repiquage en cadran sur une boîte Pylo « maison » ou Pylori Biomérieux en parallèle de l'antibiogramme. Ne pas utiliser la suspension pour le repiquage (risque de contamination).

Lecture des E-tests : Lire les CMI après 48-72h d'incubation à 35°C en atmosphère microaérobie. Vérifier la concordance de la CMI Clarithromycine (résistance ou sensibilité) avec le résultat de biologie moléculaire (si réalisée) Si une discordance est observée, contrôler le résultat.

Les résistances à la tétracycline et rifampicine sont rares : toute résistance doit être contrôlée.

III.3 Congélation des souches pour conservation

Matériels

- Microtubes Sarstedt de 2ml (réf 1626885) ;
- Bouillon Glycérol peptoné à 25% (contacter le CNR pour composition et préparation) ;
- Ecouvillons stériles.

A l'aide d'un écouvillon, faire une suspension bactérienne très riche de la souche à conserver dans 4 tubes de 0,5 ml de Glycérol peptoné. Noter le numéro de la souche et la date de congélation sur chaque tube et congeler les 4 tubes dans un congélateur -80°C.