

23 • Helicobacter pylori

Plan du chapitre

- 1• Contexte
- 2• Objectifs de la recherche de *H. pylori*
- 3• Méthodes de recherche de *H. pylori*
 - Méthodes directes invasives
 - Méthodes indirectes non invasives
 - Performances des méthodes
- 4• Antibiogramme

1 • Contexte : rôle de *H. pylori* dans les maladies gastriques

Helicobacter pylori (Hp) est un bacille hélicoïdal à Gram négatif caractérisé en 1983. Il est mobile par une ciliature polaire, microaérophile et croît lentement. Il appartient au groupe des bactéries adaptées aux mucus digestifs (*Helicobacter*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter*).

H. pylori est strictement inféodé à la muqueuse gastrique humaine. La contamination est inter-humaine, et se fait sans doute sur le mode oro-oral. Les sujets infectés ont tous une réaction inflammatoire de la muqueuse (gastrite) et une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée contre la bactérie. Un à 2% d'entre eux seulement présentent suffisamment de symptômes pour consulter. L'éradication spontanée est rare et l'état inflammatoire persiste aussi longtemps que la bactérie est présente (souvent plusieurs décennies). La gastrite à *Helicobacter* peut rester stable ou évoluer, soit vers une maladie ulcéreuse, soit vers une atrophie de la muqueuse pouvant aboutir à un adénocarcinome. Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse gastrique (mucosa associated lymphoid tissu ou MALT) qui apparaît lors de l'infection gastrique à *H. pylori* peut être à l'origine de lymphomes. Les facteurs qui conditionnent ces différents modes évolutifs sont encore peu connus mais on peut penser qu'ils sont à la fois liés à la souche infectante et à la réponse de l'hôte. L'éradication des bactéries fait régresser l'inflammation, diminue fortement le risque de récurrence des maladies ulcéreuses et le risque d'évolution carcinomateuse. Les lymphomes à *H. pylori* régressent également après éradication de l'infection.

2 • Objectifs de la recherche de *H. pylori*

La mise en évidence de *H. pylori* sur la muqueuse gastrique se justifie pour documenter une dyspepsie, pour évaluer l'efficacité d'un traitement d'éradication de la bactérie et pour évaluer le risque de développement d'une maladie gastrique associée à *H. pylori*.

En 1995, une **conférence de consensus** organisée par l'ANDEM a fait les recommandations suivantes : *H. pylori* doit être recherché chaque fois que son éradication apporte un bénéfice au malade. D'une façon générale, le problème se pose chez des patients ayant une symptomatologie digestive haute suffisamment importante pour justifier une endoscopie ceso-gastro-duodénale.

En cas d'ulcère duodénal, la recherche de *H. pylori* doit être faite dans une ou deux biopsies pratiquées dans l'antrum au cours de l'endoscopie initiale. Le consensus admet implicitement qu'une simple gastrite constatée à l'endoscopie ne justifie pas la recherche de *H. pylori*.

En cas d'ulcère gastrique le risque de méconnaître un adénocarcinome oblige à pratiquer une biopsie. La recherche de *H. pylori* est alors recommandée dans les biopsies pratiquées au niveau de l'antrum et de la partie fundique haute de la grande courbure.

Après une tentative thérapeutique, le consensus recommande de vérifier l'éradication de *H. pylori* par des tests non invasifs et notamment par le test respiratoire (voir plus bas). En cas d'échec de l'éradication, il est recommandé de chercher à isoler la souche dans une nouvelle biopsie pour pratiquer un antibiogramme.

Les méthodes recommandées pour identifier *H. pylori* sont les suivantes :

- Lors de l'endoscopie initiale, on met en évidence les bactéries spiralées au cours de l'examen anatomo-pathologique des pièces biopsiques et on pratique un test à l'uréase (voir plus bas) en salle d'endoscopie.
- Pour contrôler l'éradication de la bactérie, le test respiratoire est pratiqué 4 à 6 semaines après l'arrêt du traitement."

Ce consensus n'est pas satisfaisant sur tous les points. En particulier, les recours à l'isolement de la souche par culture et à l'antibiogramme ne sont pas

suffisants. En effet, le test à l'uréase est peu sensible et la recherche de *H. pylori* lors de l'examen anatomo-pathologique a des performances très différentes d'un laboratoire à l'autre, avec des possibilités de confusion avec d'autres bactéries spirales comme *H. heilmannii*. Par ailleurs, on ne peut plus considérer que les souches de *H. pylori* ont un profil de résistance aux antibiotiques constant. La fréquence des résistances primaires aux traitements habituellement utilisés est maintenant suffisamment élevée pour que l'isolement et l'antibiogramme des souches soient justifiés lors de l'examen initial.

La sérologie, qui n'est recommandée par le consensus que pour les études de séroprévalence, est, elle aussi, sous-utilisée. Cet examen est actuellement l'un de ceux qui a les meilleures performances en terme de sensibilité et de spécificité. Il est simple, ne nécessitant qu'un prélèvement sanguin, peu onéreux et il est remboursé par la sécurité sociale. Dans de nombreux cas, la sérologie mériterait d'être utilisée en dépistage avant l'endoscopie. Par ailleurs l'éradication de l'infection s'accompagne d'une chute significative en 4 à 6 mois, du taux d'anticorps sériques qui peut être utilisée pour vérifier à distance le succès d'un traitement.

3 • Méthodes de recherche de *H. pylori*

Ces méthodes sont classées en "invasives" ou "non invasives", selon qu'elles nécessitent ou non une fibroscopie gastro-duodénale.

1- Méthodes directes invasives

Elles consistent à pratiquer plusieurs biopsies de la muqueuse antrale ou fundique au cours d'un examen endoscopique et à rechercher les bactéries dans ces prélèvements biopsiques.

➔ Prélèvement pour un examen bactériologique

Au cours d'une endoscopie gastrique, prélever plusieurs biopsies dans l'antra à environ 3 cm du pylore. Pour un contrôle d'éradication, prélever en plus au niveau du tiers supérieur du fundus.

Les prélèvements doivent être adressés au laboratoire de bactériologie dans les trois heures qui suivent en conservant les biopsies dans un récipient stérile contenant 0,5 ml de bouillon thioglycolate ou d'eau physiologique stérile. Si le délai avant examen est compris entre 3 heures et 24 heures, il faut utiliser un milieu de transport de type Stuart. Si ce délai est supérieur à 24 heures, la biopsie doit être acheminée congelée dans un tube sec.

On doit adresser également des biopsies en anatomo-pathologie.

La recherche de *H. pylori* a pu être également proposée dans le suc gastrique obtenu par tubage, dans la salive ou dans les selles. Ces méthodes sont jusqu'à présent non validées pour le diagnostic standard.

➔ Mise en évidence des germes

◆ Recherche de l'activité uréasique

Cette méthode est adaptée à une recherche rapide en salle d'endoscopie dès le prélèvement effectué. Elle consiste à rechercher l'activité uréasique des germes dans un fragment de biopsie. Un fragment de biopsie est placé dans un liquide tamponné à pH 6,4 - 6,8 faiblement gélosé et contenant de l'urée 5 à 10 mMolaire avec un indicateur de pH (le plus souvent le rouge de phénol). Beaucoup de tests contiennent également un agent bactériostatique pour inhiber la croissance des bactéries uréase positive comme les *Klebsiella* ou les *Proteus*. En présence de l'uréase préformée provenant des cellules de *H. pylori*, l'urée est hydrolysée en ammoniac et CO₂ en quelques minutes à quelques heures. La réaction s'accompagne de l'alcalinisation du milieu et du virage de l'indicateur. La réaction est possible à température ordinaire mais la sensibilité est supérieure à 37°C. Il existe de nombreux kits diagnostiques commerciaux adaptés à un usage en salle d'endoscopie.

◆ Examen direct

La recherche de *H. pylori* par examen direct peut se pratiquer au laboratoire de bactériologie ou au laboratoire d'anatomopathologie.

- Au laboratoire de bactériologie

Les biopsies sont, soit broyées, soit dilacées stérilement au scalpel dans une boîte de Pétri. Le produit est étalé sur une lame et classiquement coloré par la méthode de Gram. Les *H. pylori* apparaissent comme des germes spirales à Gram négatif. Ils sont parfois rares ou groupés en "bancs de poissons". La recherche à fort grossissement doit être suffisamment complète (observer 20 à 50 champs au moins).

Des colorations spéciales peuvent être réalisées comme la coloration à l'acridine orange.

- Au laboratoire d'anatomopathologie

Les coupes sont colorées par diverses colorations, la plus répandue étant le Giemsa modifié (méthode de Romanovsky) ou la coloration argentique (méthode de Warthin et Stary).

◆ Culture

C'est la méthode de référence. Elle est très spécifique mais peu sensible du fait du caractère "capricieux" des primo-cultures et des faux négatifs par erreur d'échantillonnage.

La biopsie dilacérée ou broyée est ensemencée de préférence en milieu solide.

Le milieu est constitué d'une base gélosée (milieu *Brucella*, cœur-cervelle, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10% de sang de cheval, mouton ou humain. Certains auteurs ont proposé de remplacer le sang par du sérum (de veau, de cheval ou humain). D'autres suppléments de croissance ou de détoxification ont été proposés (β -cyclodextrine, charbon, amidon etc.). Les bases Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton additionnées de 10% de sang de mouton conviennent à la plupart des souches.

Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels (flore buccale surtout). Le mélange de Skirrow proposé pour isoler les *Campylobacter* dans les selles peut être utilisé ainsi que le mélange de Dent et Mc Nulty à la cefsulodine.

L'atmosphère d'incubation doit être appauvrie en oxygène par rapport à l'air. En pratique, une concentration de 5% d'oxygène convient à la plupart des souches. Cette tension réduite en oxygène peut être obtenue dans des enceintes closes (jarres) avec des générateurs de CO₂ ou de CO₂ et d'hydrogène (gas-pack). En subculture, beaucoup de souches peuvent croître en atmosphère simplement enrichie en CO₂ à 10%. L'atmosphère doit être humidifiée.

La température optimale de culture est de 37°C. En primo-culture, les colonies apparaissent en 3 à 12 jours sur gélose au sang. En subculture, la croissance est plus rapide (2 à 4 jours). Les primo-cultures doivent donc être incubées 12 jours et examinées chaque jour à partir du 3^e. Certaines cultures dégéné-

rent rapidement. Il convient donc de démarrer les subcultures dès que les colonies sont visibles. Dans le cas de cultures pauvres, une subculture peut être tentée sur une petite surface de gélose (culture "en spot"). On peut également "réétaler les colonies" dans une autre zone du même milieu (à condition qu'il ne contienne aucun contaminant). Ces procédés favorisent la culture des souches difficiles.

Une subculture en milieu liquide est possible dans un milieu à 10% de sérum additionné de 1% de β -cyclodextrine. La culture en milieu diphasique avec une phase gélosée et une phase liquide supplémentées en sérum donne de bons résultats notamment pour mettre en évidence la mobilité, pour obtenir une masse bactérienne importante ou des produits bactériens relargués dans le milieu (toxine vacuolisante).

◆ Identification

- Les colonies de *H. pylori* sont petites (0,5 mm) ou en nappes, brillantes, non hémolytiques, oxydase et uréase positives. Elles poussent lentement en microaérophilie.
- A l'examen direct, les bactéries sont Gram négatif, spiralées ou arquées ou en forme de U ou de O. Dans les cultures âgées des formes coccoïdes non subcultivables apparaissent.
- *H. pylori* possède une oxydase, une catalase et une uréase très actives. Cette dernière enzyme peut être recherchée en milieu urée-indole de Ferguson; la mise en suspension d'une pointe de pipette de colonies dans quelques gouttes de milieu fait virer le milieu au rouge en quelques minutes.
- Aucun diagnostic différentiel n'est à envisager. *H. pylori* est la seule bactérie retrouvée dans l'estomac humain avec *H. heilmannii* qui ne pousse pas dans ces conditions. De façon exceptionnelle, le diagnostic différentiel peut se poser avec des *Campylobacter* mais ces derniers sont uréase négative (à l'exception de *C. lari* biovar UPTC).

◆ Autres méthodes de diagnostic direct

La détection par PCR de gènes de *H. pylori* a été proposée et des kits commerciaux sont en cours d'évaluation.

Différenciation entre les <i>Helicobacter</i> humains				
Caractères	<i>H. pylori</i>	<i>H. cinediæ</i>	<i>H. fennelliaë</i>	<i>H. heilmannii</i>
Cultivable	+	+	+	-
Uréase	+++	-	-	
Réd .NO ₃	-	+	-	
Ac Nalidixique	R	S	S	
cult. avec :				
Bile 1%	-	+	+	
Glycine 1%	-	+	++	
Biotope	Estomac	Selles	Selles	Estomac

2- Méthodes indirectes non invasives

➔ Test respiratoire à l'urée marquée (Breath test)

Cette méthode consiste à mettre en évidence l'activité uréasique de la bactérie en faisant ingérer au patient de l'urée marquée au ¹³C (isotope non radioactif), puis à détecter le CO₂ marqué dans l'air expiré. Le ¹³C est un isotope stable non radioactif du carbone. Il est donc inoffensif et peut être utilisé sans autorisation spéciale. Cette méthode est simple mais nécessite une connexion avec un laboratoire capable de doser le ¹³CO₂ par spectrographie de masse.

➔ Sérodiagnostic

Cette méthode est simple et à la portée de tous les laboratoires.

◆ Prélèvement

Deux ml de sang dans un tube sec. Le sérum décanté, aliquoté et congelé à -20°C peut être conservé plusieurs mois.

◆ Méthode

Un assez grand nombre de kits diagnostiques basés sur des ELISA ou des Western-blots sont à la disposition des biologistes pour la réalisation de ces méthodes sérologiques.

Après l'infection, les IgG sériques sont détectables en 10 à 20 jours selon les sujets. Elles atteignent rapidement un maximum et restent élevées tant que l'infection persiste. Après l'éradication de la bactérie par un traitement antibiotique, le taux d'IgG diminue pour devenir, en 4 à 6 mois, comparable à celui des sujets non infectés. En cas d'échec thérapeutique, il peut rester élevé ou diminuer, puis réaugmenter. Le diagnostic de colonisation par *H. pylori* peut être porté par une seule sérologie si elle est franchement posi-

tive. En cas de résultat douteux ou de discordance avec une autre méthode de diagnostic, il est sage de pratiquer une seconde sérologie 15 à 30 jours plus tard avec le même ELISA (cas d'une infection récente ou d'un patient ayant une réponse faible), ou/et de pratiquer un second test utilisant un antigène différent (cas d'une souche infectante ayant un profil antigénique très différent de la préparation antigénique utilisée).

Les deux méthodes indirectes ont l'avantage de ne pas nécessiter d'endoscopie et d'être des méthodes dites "globales" c'est-à-dire qui explorent la totalité de la muqueuse gastrique. Elles sont sensibles et spécifiques et permettent un suivi de l'infection. Elles ont l'inconvénient d'être des méthodes indirectes qui ne permettent pas l'isolement des bactéries.

3- Performances des méthodes de diagnostic

Il n'existe pas de véritable méthode de référence pour le diagnostic de l'infection gastrique par *H. pylori*. La culture est la méthode la plus spécifique mais manque de sensibilité. Les méthodes indirectes qui ont considérablement amélioré leurs performances sont probablement les plus performantes mais elles ne permettent pas l'isolement de la souche et la réalisation d'un antibiogramme. Nous préconisons, pour l'instant, d'utiliser simultanément deux méthodes pour le diagnostic initial de l'infection. Une méthode directe (culture ou examen direct) et une méthode indirecte (sérologie ou test respiratoire).

4• Antibiogramme

◆ La méthode d'antibiogramme standard par diffusion n'est pas adaptée à *H. pylori*. On peut réaliser des CMI par dilution en gélose ou par "E-test" sur gélose de Mueller-Hinton supplé-

mentée par 10% de sang de mouton. Le E-test donne les résultats les plus reproductibles.

- ◆ Il faut étudier le métronidazole (30% de souches résistantes), la clarithromycine (20% de souches résistantes), les tétracyclines et l'ampicilline qui sont les antibiotiques habituellement utilisés.
- ◆ Noter que les corrélations clinico-biologiques qui permettent d'établir les CMI critiques n'ont pas été établies. Il s'ensuit de grandes incertitudes dans l'interprétation des résultats de CMI.

Bibliographie

- BIGARD M.A., COLIN R. Le consensus français sur le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*. pp. 469 - 492. In : *Helicobacter pylori* : volume 2, Clinique, Traitement. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.
- BRULEY DES VARANNES S. Tests à l'uréase pour la détection de *Helicobacter pylori*. pp. 321 - 328. In : *Helicobacter pylori* : volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.
- FAUCHÈRE J.L. Evaluation of the anti-*Helicobacter pylori* serum antibody response. pp. 50 - 73 In : *Helicobacter pylori* : techniques for clinical diagnosis and basic research. A. Lee and F. Mégraud ed. W.B. Saunders Company, 1996.
- GLUPCZYNSKI Y. Sensibilité des *Helicobacter pylori* aux agents antimicrobiens. pp. 317 - 340. In : *Helicobacter pylori* : volume 2, Clinique, Traitement. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.
- LOGAN R., BAZZOLI F. Les tests respiratoires à l'uréase pour la détection de *Helicobacter pylori*. pp. 329 - 348. In : *Helicobacter pylori* : volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.
- LOZNIIEWSKI A., AUCHER P. DE KORWIN J.D., FAUCHÈRE J.L. Méthodes sérologiques pour l'infection à *Helicobacter pylori*. pp. 349 - 366. In : *Helicobacter pylori* : volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.
- MÉGRAUD F. Diagnostic bactériologique standard de l'infection à *Helicobacter pylori*. pp. 249 - 266. In : *Helicobacter pylori* : volume 1, Epidémiologie, Pathogénie, Diagnostic. F. Mégraud et H. Lamouliatte ed. Collection Option Bio, Paris, 1997.

