



PUBLICATION DU CONSEIL SUPERIEUR DE LA SANTE N° 8670

Applicabilité des méthodes de détection de la contamination bactérienne dans les concentrés plaquettaires et intérêt pour la sécurité transfusionnelle

4 mai 2011

1. INTRODUCTION ET QUESTION

En date du 10 juin 2010, le Conseil Supérieur de la Santé (CSS) a reçu une demande d'avis de madame la ministre des Affaires Sociales et de la Santé Publique¹ concernant la détection de la contamination bactérienne des concentrés plaquettaires par la méthode *Platelet Pan Genera Detection*[®].

Puisque différents procédés de détection de contamination bactérienne sont actuellement disponibles sur le marché, le CSS a jugé opportun de rendre un avis sur l'ensemble de ceux-ci et de ne pas se focaliser sur une méthode en particulier.

Alors que la réduction de la transmission virale par transfusion a été une priorité depuis plus de vingt ans, la transmission d'une infection bactérienne par transfusion demeure toujours associée à un risque élevé de morbidité et de mortalité. Elle constitue actuellement le risque infectieux le plus élevé de la transfusion (Védy et al., 2009). Compte tenu des conditions de conservation (température et composition du milieu de suspension) qui favorisent la croissance bactérienne, la contamination bactérienne concerne surtout les concentrés plaquettaires. A titre illustratif, on estimait, en 2004, que le risque de contamination bactérienne des concentrés plaquettaires était 50 à 250 fois plus élevé que les risques combinés de transmission des virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et de l'hépatite C et des HTLV-1 et -2 (Ribault et al., 2004).

Le spectre des contaminations bactériennes s'étale, de la simple détection des bactéries par une surveillance des composants sanguins en routine sans conséquence clinique, jusqu'au décès du receveur. Chaque année, les programmes d'hémovigilance rapportent des cas de réactions transfusionnelles graves liées à la contamination bactérienne des composants sanguins: 9 cas dont un léthal en France en 2008 (EFS, 2009), 7 cas en 2009 (AFSSAPS, 2010) et 6 cas dans le rapport SHOT 2009 au Royaume-Uni (Taylor et al., 2010). Les données belges concernant les réactions septiques dues à la transfusion de concentrés plaquettaires comprennent, malgré le screening microbiologique systématique, 5 réactions septiques signalées dans le cadre de l'hémovigilance durant la période 2006 – 2008 (AFMPS, 2007; AFMPS, 2008; AFMPS, 2010). Durant cette période, 193.000 concentrés ont été administrés (soit 1:38.000 réactions).

¹ Courrier de Mme. L. Onkelinx, ministre des Affaires Sociales et de la Santé publique (sous réf. LO/LB/KVDW/gvg/___), du 27/05/10, adressé à M. J. Neve, Président du CSS.

En Belgique, le dépistage ou la réduction des bactéries dans les concentrés plaquettaires est pratique courante (Bosly et al., 2007) et reconnu nécessaire tel que recommandé par le CSS (CSH², 2005): « *La conservation des concentrés plaquettaires jusqu'à 7 jours nécessite la détection ou la réduction d'une éventuelle contamination bactérienne* ».

L'objectif du présent avis est de répondre aux questions suivantes:

1. La détection de la contamination bactérienne dans les concentrés plaquettaires permet-elle d'améliorer la sécurité de la transfusion ?
2. Quelle est son applicabilité dans notre pays ?
3. Quels sont les avantages et inconvénients d'une détection de la contamination bactérienne par rapport aux techniques de réduction des pathogènes ?

Afin de répondre à ces questions, la demande d'avis a été confiée au groupe de travail « Sang et dérivés sanguins » ayant des expertises en transfusion sanguine et microbiologie.

2. CONCLUSION

1. La détection de la contamination bactérienne dans les concentrés plaquettaires permet-elle d'améliorer la sécurité de la transfusion ?

S'il est clair que la réponse est oui, ceci doit être nuancé par la réponse fournie au point 3.

2. Quelle est son applicabilité dans notre pays ?

Il existe deux stratégies possibles: une méthode de culture bactérienne appliquée peu après le prélèvement ou l'utilisation d'un test rapide juste avant la délivrance. Chacune offre des avantages et des inconvénients: le gain apporté par chacune est comparable, ce qui signifie que l'une et l'autre peuvent être utilisées comme deux alternatives équivalentes (sauf pour les méthodes à faible sensibilité).

Cependant, si les établissements de transfusion belges ont une grande habitude d'utilisation des méthodes de culture, l'implémentation de tests rapides va créer des problèmes logistiques difficiles à appréhender, parmi lesquels il faut évoquer les taux substantiels de faux positifs, indéterminés et non confirmés, l'organisation pratique, les problèmes d'approvisionnement et la répartition des responsabilités entre l'établissement de transfusion sanguine et l'institution hospitalière.

3. Quels sont les avantages et inconvénients d'une détection de la contamination bactérienne par rapport aux techniques de réduction des pathogènes ?

Les données publiées actuellement suggèrent que la détection bactérienne par les méthodes disponibles peut présenter une fausse sensation de sécurité. En effet, on sait que l'approche par le dépistage, quelle que soit la méthode choisie, connaît une efficacité qui diminue avec le niveau de contamination bactérienne, tandis que la réduction des pathogènes est d'autant plus efficace que les niveaux de contamination sont faibles.

En conclusion, bien que les critères de sélection des donneurs aient été améliorés et les tests utilisés pour le dépistage aient permis de réduire considérablement les risques de transmission infectieuse par la transfusion (parmi lesquels il faut citer la contamination bactérienne), il existe différentes voies pour qu'un agent pathogène échappe à la détection et contamine le receveur. La période silencieuse, l'insuffisance de sensibilité de certains tests, et l'émergence de nouveaux agents pathogènes en sont les principaux exemples. La réduction des pathogènes appliquée aux composants sanguins peut apporter une réponse aux trois préoccupations, comme elle l'a fait

² CSH: Conseil Supérieur d'Hygiène, ancienne dénomination du Conseil Supérieur de la Santé.

pour les médicaments dérivés du plasma. Ces techniques ont néanmoins comme désavantage d'occasionner un dommage fonctionnel aux plaquettes traitées et de diminuer leur récupération après transfusion. Bien évidemment, en cas d'urgence d'un nouveau pathogène, le taux de réduction doit être vérifié.

3. ELABORATION ET ARGUMENTATION

Abréviations utilisées: ADN = acide désoxyribonucléique; ARN = acide ribonucléique; CFU = *colony forming units*; CMV = cytomégalovirus; FDA = *Food and Drugs Administration*; HTLV = *human T-cell lymphotropic virus*; PCR = *polymerase chain reaction*; SHOT = *Serious Hazards of Transfusion*; TOI = *time-of-issue*; NAT = *nucleic acid testing*.

3.1 Méthodologie

L'avis est basé sur une révision systématique des meilleures connaissances et preuves existantes. Elle est le résultat d'une recherche approfondie des listes de références de tous les articles pertinents et d'articles disponibles en ligne avant parution auprès des journaux principaux en transfusion clinique. Ces données ont été complétées avec des recherches d'articles apparentés via la base de données PubMed. Trois auteurs ont également été contactés pour obtenir des renseignements supplémentaires permettant de mieux juger la pertinence des résultats.

3.2 Elaboration

3.2.1. Etat des lieux et risques actuels

La différence fondamentale entre une contamination par des virus d'une part et des bactéries d'autre part, réside dans le fait que ces dernières sont capables de se multiplier abondamment durant la conservation des concentrés plaquettaires (Müller et al., 2008). On estime que dans les conditions de conservation habituelles (22 ± 2 °C), le nombre de bactéries peut dépasser 10^{10} CFU (*colony forming units*) par poche (Montag, 2008). Or, une contamination bactérienne supérieure à 10^5 CFU/mL peut occasionner des complications infectieuses sévères même si cela dépend fortement de la nature du micro-organisme et de la sensibilité du patient (Morel et al., 2003).

L'ampleur du problème n'est pas toujours facile à évaluer et l'estimation du risque réel varie d'une étude à l'autre. Différents éléments contribuent à ce fait, parmi lesquels on peut citer l'absence de méthode de détection suffisamment sensible, la reconnaissance inadéquate des réactions septiques par les cliniciens (Rao et al., 2007; Traore et al., 2009), les différences méthodologiques et le moment de réalisation des tests de détection bactérienne dans les concentrés plaquettaires (Palavecino et al., 2006).

Il existe quatre sources de contamination bactérienne des composants sanguins (Wagner, 2004):

1° la peau du donneur à l'endroit de ponction: une bonne désinfection cutanée réduit la charge bactérienne, mais ne permet pas de stériliser complètement le site de ponction, en particulier en cas de cicatrice qui peut être un lieu de « refuge » pour certains germes, inatteignable par les désinfectants. Il faut noter que la peau n'est pas la seule responsable puisque deux tiers des décès rapportés dans le système d'hémovigilance américain de la *Food and Drugs Administration* (FDA) sont dus à des bactéries qui ne sont pas typiques de la flore cutanée (Yomtovian et al., 2007);

2° le sang du donneur: certains donneurs peuvent présenter une bactériémie asymptomatique de faible importance, soit chronique (comme dans le cadre d'une ostéomyélite chronique), soit transitoire (après soins dentaires, par exemple). L'examen médical pré-don est un élément de prévention essentiel dans ce cadre;

3° le matériel à usage unique utilisé pour le prélèvement: si cette éventualité est très rare, on se rappellera cependant les 11 cas décrits de contamination par *Serratia marcescens* en Suède et au Danemark au début des années 90 (Heltberg et al., 1993; Hogman et al., 1993);

4° l'environnement: cette source de contamination n'engendre un risque qu'en cas de rupture du système clos lors du prélèvement, de la préparation ou de la conservation des composants sanguins.

Grâce aux mesures de précaution mises en place par les établissements de transfusion sanguine (cf. *infra*), il est généralement accepté que les niveaux de contamination initiaux par les bactéries dans les unités infectées sont très faibles, de l'ordre de 1 à 10 CFU/mL (soit 300 à 3.000 CFU par concentré plaquettaire) (Prowse, 2007).

La mise en culture systématique des concentrés plaquettaires permet d'estimer le taux de contamination bactérienne de concentrés plaquettaires à 1 sur 2 à 3.000 (Védy et al., 2009). Lorsque les concentrés plaquettaires sont remis en culture au huitième jour de leur conservation, ce taux s'élève à 1 sur 1.500 (Murphy et al., 2008). Si la détection est réalisée à péremption, on peut atteindre des taux de 1 sur 385, tel que montré dans l'étude de Walther-Wenke réalisée en 2001 et publiée en 2006 (Walther-Wenke et al., 2006). Heureusement, la plupart des unités contaminées n'engendrent pas de réaction transfusionnelle, particulièrement lorsque le taux de contamination bactérienne est faible. Cependant un sous-rapportage des événements indésirables semble évident puisqu'une surveillance active (méthode prospective systématique de surveillance) permet de détecter 32 fois plus de composants sanguins contaminés et 10,6 fois plus de réactions septiques que la surveillance passive (investigations réalisées suite à la déclaration de réactions transfusionnelles) (Jacobs et al., 2008).

En terme de conséquences cliniques, on estime, en France, que le risque de réaction septique post-transfusionnelle est de 1 sur 25.000 concentrés plaquettaires distribués; il est de 1 sur 108.000 dans un rapport de la Croix-Rouge américaine (Benjamin, 2010). Le risque de décès par sepsis transfusionnel, quant à lui, a été calculé et se situe entre 1 sur 20.000 et 1 sur 100.000 dans une étude hollandaise (De Korte et al., 2006) à 1 sur 200.000 en France et 1 sur 500.000 aux Etats-Unis (Védy et al., 2009).

La reconnaissance d'un sepsis transfusionnel peut être difficile au lit du patient, spécialement lorsque les malades sont déjà fébriles avant la transfusion et/ou sont sous traitement antibiotique pour un sepsis d'une autre origine. Le nombre de cas cliniques confirmés et rapportés doit donc être considéré comme le sommet de l'iceberg (Wood, 2010). Selon la définition du groupe SHOT (*Serious Hazards of Transfusion*; cf. Taylor et al., 2010), une infection transmise par transfusion est confirmée lorsque:

- le receveur présente, de façon évidente, une infection après la transfusion qu'il n'en avait pas avant la transfusion et qu'il n'y a pas d'autre source d'infection;
- et lorsqu'au moins un des composants sanguins reçus par ce receveur provient d'un donneur qui présente, de façon évidente, le même germe;
- ou lorsqu'on a pu mettre en évidence l'agent infectieux dans au moins un des composants transfusés.

La sévérité des manifestations cliniques liées à la transfusion de concentrés plaquettaires contaminés est déterminée par des paramètres tant quantitatifs que qualitatifs (nombre de CFU transfusés, type de bactérie concernée, taux de prolifération bactérienne, phase de latence). Mais, la sévérité d'une réaction septique dépend aussi de paramètres liés au patient et peut donc être plus grande chez les patients immunodéprimés (Védy et al., 2009). Plusieurs études ont rapporté une corrélation entre les taux de contamination et la sévérité de la réaction, avec des seuils évalués à 10^5 (Jacobs et al., 2008) ou 10^6 CFU/mL (Yomtovian et al., 2006) pour les réactions graves. Cependant, la virulence de la bactérie semble un facteur plus important que la charge bactérienne (Yomtovian et al., 2006). Ces auteurs ont par ailleurs décrit des réactions septiques (fièvre, frissons, hypotension) avec des staphylocoques coagulase-négatifs dont la concentration ne dépassait pas 10^2 CFU/mL.

La majorité des bactéries mises en évidence dans les unités plaquettaires impliquées dans des sepsis transfusionnels sont des bactéries aérobies à coloration Gram positive (Eder et al., 2007). Néanmoins, en présence de germes à coloration Gram négative, le risque de décès est plus grand (60 %) par rapport à celui observé en cas de sepsis transfusionnel à germes dont la coloration de Gram est positive (40 %) (Wagner, 2004).

3.2.2. Méthodes de détection de la contamination bactérienne applicables aux concentrés plaquettaires

Les stratégies disponibles pour détecter la présence de bactéries dans un composant sanguin comportent (Wood, 2010):

- les tests de contrôle de qualité;
- le dépistage de surveillance en routine ou tout autre test réalisé juste avant la délivrance;
- l'inspection visuelle de l'aspect des composants dans l'établissement de transfusion sanguine, à la banque de sang hospitalière et au lit du malade juste avant la transfusion;
- le suivi attentif des patients durant et après la transfusion.

Un système de dépistage idéal d'une contamination bactérienne devrait combiner la meilleure sensibilité possible (afin de détecter tous les cas pertinents) avec une spécificité adéquate (pour prévenir la mise à l'écart non pertinente de composants). Il devrait aussi se présenter comme une méthode rapide, automatique, simple, techniquement robuste et à un coût raisonnable. Finalement, les résultats devraient pouvoir être facilement intégrés dans la banque de données des services de transfusion (Müller et al., 2008).

A côté d'approches conventionnelles (mesure du pH et coloration de Gram) ou indirectes, deux catégories de méthodes différentes sont disponibles: les méthodes de culture et les méthodes dites rapides.

- Les méthodes de culture requièrent un certain délai avant production d'un signal puisqu'elles dépendent de la croissance des bactéries. Elles doivent donc être réalisées sur un échantillon prélevé précocement (un jour après le don). Leur avantage réside dans leur implémentation relativement simple dans la logistique des établissements de transfusion sanguine. Cependant, à cause du taux de contamination initial très faible après le don, un certain nombre d'« erreurs d'échantillonnage » (faux négatifs) accompagne l'application de cette stratégie.

- Les méthodes rapides permettent d'obtenir un résultat en un temps réduit, ce qui autorise à postposer la prise d'échantillon. Une prise d'échantillon tardive combinée à un test rapide permet d'éviter la transfusion de composants hautement contaminés qui mènerait à un choc septique voire au décès du patient (Montag, 2008). Par contre, ces procédures entraînent des complications logistiques. Le seuil de détection souvent bien plus élevé que la méthode par culture pourrait être responsable de faux négatifs supplémentaires pour des germes à potentiel septicémique.

Ces différentes approches sont décrites ci-dessous.

3.2.2.1. Les tests indirects et le dépistage conventionnel par coloration de Gram

1) Les tests indirects

Ils comportent la mesure du pH et la détermination du taux de glucose dans le concentré plaquettaire, généralement par l'utilisation de tiges. Ces tests indirects ont montré une limite de détection élevée, de l'ordre de 10^7 à 10^8 CFU/mL (Montag, 2008), et ne peuvent donc être recommandés (Védy et al., 2009). Cependant, leur application est très facile et permettrait de prévenir la transfusion de composants sanguins fortement contaminés.

2) La coloration de Gram

Bien connue dans le monde microbiologique, elle offre une sensibilité de 10^4 à 10^5 CFU/mL quand elle est appliquée aux concentrés plaquettaires. On a décrit une corrélation entre les résultats de la coloration de Gram et l'évaluation quantitative de bactéries (Yomtovian et al., 2006): c'est ainsi que la coloration de Gram était positive dans 90 % des cas (19 sur 21) pour lesquels le comptage était supérieur à 10^5 CFU/mL et négative dans 94 % des cas (17 sur 18) pour lesquels le comptage était inférieur à 10^5 CFU/mL. Cependant, ce test doit être réalisé juste avant la transfusion, ce qui rend son implémentation difficilement applicable dans la pratique courante des services de transfusion.

3.2.2.2. Les méthodes de culture

Actuellement, les méthodes de culture représentent les techniques les plus sensibles pour la détection de bactéries. Deux méthodes, applicables dans les services de transfusion, sont disponibles sur le marché:

- 1) la méthode *BacT/ALERT*[®] (bioMérieux) est un test colorimétrique de culture automatisée basé sur la détection de dioxyde de carbone produit par les micro-organismes en prolifération. Cette méthode permet la détection de bactéries tant aérobies qu'anaérobies, des levures et des champignons. La mise en culture est réalisée 24 heures après le prélèvement. Les flacons sont analysés en continu pendant une période de 5 à 7 jours. Dans des tests de contamination exogène, la médiane de croissance avant la détection d'un signal positif était de 9,3 à 18,9 heures pour une charge de 10 CFU/mL, ou de 8,7 à 18,2 heures pour une charge de 100 CFU/mL (Te Boekhorst et al., 2005). Dans des mises en culture systématiques de concentrés plaquettaires, on a constaté un délai médian de 0,7 jour en cas de contamination confirmée par des germes aérobies, alors qu'il était de 3,7 jours dans les cas de contamination par des germes anaérobies (Schrezenmeier et al., 2007). La sensibilité de la méthode est de 1 à 10 CFU/mL. En termes de spécificité, on doit noter un taux de faux positif de 1 sur 400 (Schmidt et al., 2007) à près de 1 sur 3.000 (Eder et al., 2007);
- 2) la méthode *eBDS* (Pall Corporation) est basée sur la mesure de la consommation de l'oxygène du milieu par les bactéries. La mise en culture est également effectuée 24 heures après le prélèvement. La sensibilité de la méthode se situe à 1 à 10 CFU/mL. Le délai avant détection est de 8 à 17 heures. La spécificité est de 100 %. Cependant, cette méthode présente une limite importante: elle ne permet pas la détection de bactéries anaérobies, bien que les germes anaérobies aient été rarement associés à une infection létale après transfusion de plaquettes (Jacobs et al., 2008). Le taux de faux positif est très faible (de l'ordre de 1 sur 3.000) (Schmidt et al., 2007).

Montag et al. (2010) ont récemment conduits une étude pilote du *Milliflex*[®] *Rapid Microbiology Detection System* (Millipore) sur des cultures cellulaires. Cette méthode amplifie la détection de l'adénosine-tri-phosphate des bactéries vivantes après culture de l'échantillon passé à travers un filtre retenant les bactéries. L'applicabilité sur des concentrés plaquettaires doit être investiguée.

Malgré ces résultats, ces tests ne peuvent pas prévenir la transfusion de tous les composants contaminés et ce pour deux raisons (Benjamin et al., 2007):

- les bactéries sont présentes dans l'échantillon inoculé dans les flacons de culture, mais le produit a déjà été transfusé avant que le signal ne soit positif (vrai positif retardé);
- l'échantillon inoculé ne contient pas de bactéries viables (faux négatif).

La faible concentration en bactéries constatée au moment de l'échantillonnage peut être attribuée à différentes causes:

1° contamination initiale par de petits nombres de bactéries viables: dans des tests de contamination exogène de concentrés plaquettaires par des bactéries, on a pu montrer que des concentrations bactériennes inférieures à 5 CFU/mL se soldaient par une culture dont le résultat était indéterminé voire négatif (Nussbaumer et al., 2007);

2° inactivation d'une partie des bactéries par des facteurs anti-bactériens contenus dans le sang (effet bactéricide);

3° phase de latence prolongée avant la prolifération bactérienne;

4° espèce bactérienne qui se multiplie lentement dans les conditions aérobies de conservation des plaquettes;

5° temps de répllication allongé (« fenêtre silencieuse »): c'est la raison pour laquelle l'échantillon pour culture bactérienne doit être prélevé avec un certain délai parce qu'il pourrait ne contenir aucune bactérie (loi de Poisson) et donner lieu à un résultat faux négatif (Montag, 2008). Ce délai n'est toutefois pas toujours suffisant à cause de la phase de latence (*lag phase*) qui peut être plus longue pour certaines bactéries.

Des facteurs physiques peuvent également intervenir, comme l'adhérence des bactéries aux biofilms protéiques qui recouvrent l'intérieur des poches de conservation des plaquettes ou le relargage de bactéries viables après cytolysse des leucocytes lors de la conservation.

Le taux de résultats faux négatifs a été évalué à 1 sur 14.000 dans une étude hollandaise (Te Boekhorst et al., 2005) et à 1 sur 50.000 par la Croix-Rouge américaine (Eder et al., 2009) et le Paul-Ehrlich Institut (Burkhardt et al., 2005). Si le concentré plaquettaire est systématiquement remis en culture au jour 7, on peut estimer que le risque de faux négatif pour les mises en culture au jour 1 s'élève à 1 sur 500 (Larsen et al., 2005). Pour diminuer ce risque de faux négatif, il a été proposé de doubler le volume de concentré plaquettaire mis en culture, ce qui a permis d'augmenter la sensibilité du test de 54 % (Eder et al., 2009). Mais si utiliser un plus grand volume permet d'accroître la sensibilité de détection, cela réduit la dose finale du produit disponible pour la transfusion (Nussbaumer et al., 2007). Un compromis entre ces deux contraintes est donc nécessaire en pratique.

En utilisant une méthode de culture, les concentrés plaquettaires sont délivrés selon le principe du *negative-to-date* mais la culture est maintenue jusqu'à l'expiration du concentré. Si un signal positif est enregistré alors que le composant est déjà délivré, une procédure de rappel de produit (si le composant n'a pas encore été transfusé) ou de surveillance du patient (si la transfusion a déjà eu lieu) est mise en place. Dans l'expérience hollandaise (Te Boekhorst et al., 2005; De Korte et al., 2006), 74 % des cultures qui deviennent positives après un délai d'au moins 48 heures d'incubation concernent des produits qui ont déjà été transfusés. Aucune réaction transfusionnelle clinique n'a été rapportée, ce qui suggère soit que la charge bactérienne devait être très faible, soit que l'agent responsable de la contamination avait une pathogénicité limitée.

En conclusion, tester les concentrés plaquettaires par culture bactérienne permet de prévenir la transfusion d'un nombre significatif de concentrés plaquettaires contaminés. Cependant, il reste le problème de faux positifs qui mènent au rejet de composants sanguins conformes et celui des faux négatifs qui peuvent aboutir à des sepsis transfusionnels.

3.2.2.3. Les méthodes rapides

Les méthodes rapides ou TOI (*Time-Of-Issue*) offrent l'avantage de fournir une information en temps réel, juste avant que le concentré plaquettaire ne soit distribué. Un test TOI doit être rapide et simple, de sorte qu'il puisse être réalisé de nombreuses fois dans la journée, selon la taille du

service de transfusion. Il doit avoir une sensibilité suffisante pour éviter la délivrance de produits contaminés et une haute spécificité pour éviter le rejet de produits non contaminés (Palavecino et al., 2006; Yazer et al., 2010). De plus, elles devraient avoir une limite de détection suffisamment basse pour détecter les bactéries à fort potentiel septicémique.

A l'heure actuelle, toutes ces méthodes sont encore en cours de développement (Palavecino et al., 2010).

1) Etude des acides nucléiques (NAT)

Cette technique de biologie moléculaire est basée sur la détection de séquences consensus de l'ARN ribosomal bactérien. Des tests visant l'ADN ou l'ARN ont été déployés avec une sensibilité de 10^3 à 10^5 CFU/mL mais celle-ci peut descendre jusque 10^1 à 10^2 CFU/mL en cas d'utilisation de PCR en temps réel (Montag, 2008; Müller et al., 2008; Rood et al., 2010). Rood et al. (2010) observent en outre que la sensibilité pour des bactéries à coloration Gram positive est moins bonne que celle des bactéries à coloration Gram négative. Actuellement, le délai avant résultat est de 4 heures, ce qui est relativement long pour un test rapide. De plus, cette technique présente de nombreuses limites: coût élevé, complexité de l'utilisation et, de façon plus critique, disponibilité des réactifs d'amplification. En outre, un des problèmes pratiques les plus importants est le risque de contamination du test par de l'ADN ou ARN bactérien exogène contenu dans des réactifs d'amplification nucléotidique, particulièrement dans les enzymes bactériennes, et par les séquences d'ADN bactérien que l'on trouve de façon courante dans le sang humain (risque de faux positifs). De plus, la détection de faibles quantités d'ADN bactérien au milieu de grandes quantités d'ADN humain peut aussi poser problème (Védy et al., 2009). Par ailleurs, son désavantage majeur est la détection concomitante de bactéries mortes qui ne pourraient pas avoir de signification clinique (risque de faux positifs). L'applicabilité de cette méthode, dans le contexte de la détection de bactéries dans les concentrés plaquettaires, n'a par ailleurs pas encore été démontrée.

2) Cytométrie en phase solide

Cette technique initialement développée pour les contrôles de stérilité dans l'industrie pharmaceutique est basée sur le marquage fluorescent des acides nucléiques bactériens, suivi de la détection par scannage au laser. Pour son application aux concentrés plaquettaires, il faut d'abord éliminer les plaquettes afin d'éviter les interférences. Ceci risque de faire perdre également une partie des bactéries viables. Malgré une bonne sensibilité, de l'ordre de 10^1 à 10^2 CFU/mL selon la souche et un délai rapide avant résultat de 70 à 90 minutes (Ribault et al., 2004), la production d'un tel système a été interrompue parce que la technique était difficilement applicable en routine de transfusion (Montag, 2008).

3) Cytométrie en flux

Bien qu'un peu moins sensible que les méthodes de culture bactérienne, avec une limite de détection de 150 CFU/mL pour le système *BactiFlow*[®] (AES Chemunex) (Dreier et al., 2009). Cette technique offre l'avantage de pouvoir être appliquée juste avant la délivrance puisque le délai avant obtention du résultat est inférieur à une heure. Un fluorochrome traverse la membrane des bactéries vivantes et est scindé par des estérases cellulaires produisant ainsi un signal fluorescent permettant ainsi de distinguer les bactéries vivantes de celles qui ne le sont plus. La corrélation est excellente avec les comptages traditionnels en plaques. La cytométrie en flux peut être utilisée en méthode quantitative en utilisant des billes comme standard interne (Karo et al., 2008). La limite de son utilisation en routine est liée à la disponibilité d'un cytomètre de flux dans l'établissement de transfusion sanguine et/ou dans la banque de sang hospitalière. Le système *BactiFlow* a récemment fait ses preuves en routine de transfusion (Vollmer et al., 2011). Son taux de faux positifs de 1,7 % est comparable à celui de la culture bactérienne.

4) Immunoassay qualitatif

Ce test commercialisé récemment (*Platelet Pan Genera Detection*[®], Verax Biomedical) est basé sur une technique d'immunodiffusion, avec utilisation d'anticorps anti-lipopolysaccharides pour la détection des bactéries à coloration de Gram négative et d'anticorps dirigés contre l'acide lipotéichoïque pour la détection des bactéries à coloration de Gram positive. Il ne permet pas la détection des champignons et levures. Il est assez simple à réaliser et le résultat définitif est obtenu en 90 minutes. La spécificité de ce test est de 99,85 %; néanmoins, la valeur prédictive positive a été évaluée à 14,3 % (Yazer et al., 2010). Sa sensibilité annoncée est de 10^4 à 10^6 CFU/mL selon la souche bactérienne concernée. Ceci signifie donc que le test ne dépiste que les concentrations très élevées de bactéries (Benjamin, 2010). Toutefois, cette sensibilité chute parfois à 10^7 CFU/mL pour certaines bactéries à coloration de Gram négative (Vollmer et al., 2010). Or, bien que ce soient les bactéries à coloration de Gram positive qui sont le plus souvent mises en évidence dans les contaminations de concentrés plaquettaires, ce sont les bactéries à coloration de Gram négative qui sont responsables de la majorité des cas de décès (Jacobs et al., 2008). Vollmer et al. (2010) soulignent encore la difficulté actuelle d'obtenir un signal de détection net. Une augmentation de sensibilité semble donc requise afin d'éviter la transfusion de plaquettes contaminées par des bactéries à coloration de Gram négative. Un autre désavantage est la détection concomitante de bactéries mortes qui n'ont pas de signification clinique. Cette méthode a été autorisée par les instances compétentes américaines et européennes comme approche de détection d'adjonction faisant suite à une méthode de culture.

Une comparaison résumée des différentes méthodes actuellement disponibles sur le marché et applicables dans les établissements de transfusion sanguine est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1. Comparaison des différentes méthodes de détection bactérienne (tirée de Dreier et al., 2009).

	Méthodes de culture bactérienne	NAT	<i>BactiFlow</i> [®]	Cytométrie en flux « classique »	Immunoassay qualitatif (<i>Platelet PGD</i> [®])
Principe de détection	Diminution du pH	Amplification des acides nucléiques	Cytométrie en flux	Cytométrie en flux	Immunodiffusion
Cible	Production de CO ₂	Acides nucléiques bactériens	Activité estérase	Acides nucléiques bactériens	Lipopolysaccharides et acide lipotéichoïque
Limite de détection (CFU/mL)¹	1 – 10	20 – 30	150	10 ³ – 10 ⁵	> 8,2 x 10 ³
Délai avant résultat	> 4 heures (selon la charge bactérienne)	4 heures ²	45 à 60 minutes ³	30 minutes	90 minutes ⁴
Simplicité de la mise en œuvre	+++	+	++	++	+++ ⁴
Qualification du personnel	Moyenne (travail en conditions stériles)	Élevée	Faible	Faible	Très faible
Durée de formation du personnel	< 1 jour	2 semaines	2 jours	2 jours	< 1 jour
Équipement technique	Incubateur-détecteur automatique	Système d'extraction; thermocycler en temps réel	Cytomètre; centrifugeuse; incubateur	Cytomètre; centrifugeuse; incubateur	Centrifugeuse

¹ Il faut noter qu'une méthode de détection dont le seuil de sensibilité est de 10³ CFU/mL permet de détecter 90 % des cas de contamination (Jacobs et al., 2008).

² L'automatisation permet d'incuber environ 90 échantillons en même temps; toutefois, dans un hôpital belge, l'exécution d'une telle quantité d'échantillons en parallèle ne correspond pas à la réalité.

³ Ce cytomètre permet d'analyser 12 échantillons en parallèle.

⁴ Il existe de nombreuses étapes faciles de préparation qui sont nécessaires afin d'apprêter l'échantillon pour l'immunodiffusion. Les 90 minutes s'obtiennent en additionnant aux 30 minutes de préparation, les 60 minutes requises pour exclure un signal faussement négatif (T. Vollmer, *comm. pers.*).

5) Méthodes par spectrométrie

Il s'agit d'une méthode de spectrométrie décrite très récemment, utilisant la comparaison directe de spectres lumineux (en l'occurrence de la lumière proche de l'infrarouge, longueur d'ondes entre 700 et 1.100 nm). Les seules données actuellement disponibles sont tirées d'une étude de contamination exogène de concentrés plaquettaires par *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epidermidis* (Saranwong et al., 2010). Un résultat positif est apparu 42 heures et 54 heures respectivement, après inoculation. Les avantages de ce test sont intéressants: durée de quelques secondes avant obtention du résultat, pas de nécessité d'échantillonner le composant sanguin, sensibilité annoncée de 100 et 98 % respectivement pour les deux souches étudiées. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés ultérieurement.

Une autre méthode par spectrométrie est le test de détection des peptidoglycanes conçu par Kovalenco & Levin (2010) dont le principe d'utilisation est mentionné par Palavecino et al. (2010).

6) Autres approches innovatrices récentes

Motoyama et al. (2008) ont présenté une méthode de comptage de bactéries vivantes (colorées par un indicateur fluorescent de l'activité des estérases) à travers un système de *bioimaging* avec une sensibilité annoncée de 20 CFU/mL et dont le résultat est obtenu en 45 minutes.

Palavecino et al. (2010) ont également essayé d'évaluer quelques nouvelles techniques potentielles comme:

- biosenseurs de spores bactériennes (Rotman & Cote, 2003);
- microcalorimétrie (Trampuz et al., 2007);
- détection de la réponse physiologique des bactéries au stress (Rieder & Zavizion, 2008).

A l'heure actuelle, les méthodes diélectrophorétiques (Brecher & Hay, 2005; Cheung et al., 2010) n'ont pas été confirmées pour être utilisables en pratique.

Toutes ces approches innovantes doivent encore être améliorées pour être applicables en routine (Rieder et al., 2011) et évaluées par d'autres investigateurs.

A noter que l'utilisation de panels standardisés de bactéries pertinents pour la médecine transfusionnelle (Montag-Lessing et al., 2010) pourrait considérablement contribuer à des comparaisons valides entre laboratoires et méthodes, y inclus l'évaluation de nouvelles technologies pour la détection et la réduction des bactéries dans les composants sanguins.

En conclusion, si on imagine une méthode rapide idéale, ayant une sensibilité de 1 CFU/mL, on peut seulement établir, en cas de résultat négatif, que l'échantillon testé est stérile. Si on rapporte cela à un concentré plaquettaire d'un volume moyen de 300 mL, on peut seulement prédire que la préparation contient moins de 300 CFU. Cependant, ce calcul doit être validé puisque les bactéries ne sont pas distribuées de façon homogène dans un liquide, mais selon la loi de Poisson, ce qui peut engendrer une erreur d'échantillonnage tardif (*late sampling error*).

Cependant, un avantage indiscutable de ces méthodes rapides est qu'elles permettent d'éviter la transfusion de composants sanguins fortement contaminés et, même si toutes les contaminations et expositions à des endotoxines ne pourront être évitées, on peut s'attendre à ce que les conséquences cliniques soient moins sévères. Néanmoins, pour la détection de niveaux réduits de contamination par les bactéries potentiellement septicémiques, leur seuil de détection est souvent plus élevé que la méthode basée sur la culture.

3.2.3. Les mesures de précaution

Indépendamment des tests de détection applicables sur les produits, différents moyens ont été mis en place par les établissements de transfusion sanguine pour prévenir la contamination bactérienne des composants sanguins (Montag, 2008; Wood, 2010):

- 1) une sélection rigoureuse des donneurs, comprenant un examen médical pré-don avec exclusion des donneurs à risque de transmettre des maladies infectieuses et un suivi des informations post-don;
- 2) une sélection du site de ponction en évitant les zones cicatricielles;
- 3) une désinfection cutanée efficace, utilisant des solutions appropriées et en respect d'une procédure stricte jusqu'à la fin du don en utilisant du matériel en système clos;
- 4) le rejet des premiers millilitres de sang collecté, ce qui permet de retirer 95 à 98 % des bactéries de surface (diversion): cet échantillon de sang est utilisé pour réaliser les tests de qualification du don. Cette mesure a eu pour conséquence de diminuer le taux de contamination bactérienne des composants sanguins de 46 % (Eder et al., 2009) et le taux de réaction septique et de mortalité par infection bactérienne de 66 % (Benjamin, 2010). Il faut cependant noter que cette mesure n'offre des avantages que pour les bactéries de la flore cutanée (Yomtovian et al., 2007);
- 5) l'utilisation de procédures d'aphérèse pour limiter le nombre de « contacts donneur » par patient transfusé;
- 6) les précautions lors de la manipulation et de la conservation des composants, y compris le contrôle de l'intégrité des poches et des connexions stériles éventuelles et le respect de la température de stockage au niveau de l'établissement de transfusion et dans l'hôpital;
- 7) la surveillance de l'environnement.

Si toutes ces mesures de précaution sont mises en place et que les conditions d'hygiène sont respectées dans l'établissement de transfusion sanguine, le nombre de bactéries éventuellement présentes est, initialement, très faible. On admet généralement qu'en cas d'évènement contaminant avant le don, le composant sanguin ne contient que 10 à 100 bactéries, ce qui signifie, dans le cas des concentrés plaquettaires d'un volume d'environ 300 mL, 0,03 à 0,3 CFU/mL.

D'un point de vue clinique, on peut ajouter les mesures de précaution suivantes:

- 8) la promotion de la pratique transfusionnelle basée sur l'évidence clinique;
- 9) la réduction du temps de conservation des plaquettes autant que possible, puisqu'on sait que la croissance bactérienne augmente avec le temps. Les unités plaquettaires prélevées depuis plus de quatre jours présentent donc un risque accru de contenir de hauts taux de bactéries et donc de complication septique (Védy et al., 2009).

3.2.4. Les techniques de réduction des pathogènes

Le risque de contamination bactérienne des concentrés plaquettaires a été diminué de façon très efficace par l'implémentation de la technique de réduction des pathogènes (Cazenave, 2007). C'est en effet la seule stratégie qui a la capacité d'éliminer les principaux risques de transmission bactérienne cliniquement significative des composants sanguins (Müller et al., 2008; Webert et al., 2008; Goodrich et al., 2009).

Néanmoins, ces techniques peuvent altérer certaines fonctions des plaquettes (van der Meer et al., 2010) et leur récupération dans le sang est diminuée (Mc Cullough et al., 2004; Snyder et al., 2005; The Mirasol Clinical Evaluation Study Group, 2010). Leur efficacité clinique est moindre dans l'étude de Kerkhoffs et al. (2010) et ce dernier point est actuellement ré-évalué dans d'autres études. Actuellement, il manque des données quant à leur efficacité et innocuité chez les femmes enceintes, tout comme pour leur utilisation chez les patients avec une splénomégalie ou avec un saignement actif.

Les avantages des méthodes de réduction des pathogènes sur la détection bactérienne ont déjà été inventoriés auparavant par le CSS (CSS, 2008).

Goodrich et al. (2006) ont observé que l'efficacité d'une technique photochimique n'était pas suffisante pour complètement sécuriser les concentrés plaquettaires contre des bactéries présentes à des taux faibles (100 CFU/concentré). Ceci a été récemment confirmé par Störmer et al. (2010) en se servant du panel standardisé de bactéries. L'efficacité d'une autre technique photochimique de réduction des pathogènes pour maîtriser de telles contaminations bactériennes des concentrés plaquettaires n'a pas encore été illustrée (Brecher et al., 2007 ont utilisé des taux de 10-100 CFU/mL).

3.3. Discussion

Question 1. La détection de la contamination bactérienne dans les concentrés plaquettaires permet-elle d'améliorer la sécurité de la transfusion ?

S'il est clair que la réponse est oui, ceci doit être nuancé par la réponse fournie à la question 3.

Les questions suivantes restent ouvertes (Benjamin, 2010):

- les bactéries atteignent-elles un taux cliniquement significatif après 5 jours de conservation ?
- les espèces bactériennes impliquées dans les contaminations sont-elles cliniquement dangereuses ?

La détection de la contamination bactérienne est d'ailleurs obligatoire depuis plusieurs années dans notre pays lorsque les concentrés plaquettaires sont conservés durant sept jours, sauf s'ils subissent une méthode de réduction des pathogènes (article 9, 2°, de l'arrêté royal du 1 février 2005 modifiant l'arrêté royal du 4 avril 1996 relatif au prélèvement, à la préparation, à la conservation et à la délivrance du sang et des dérivés du sang d'origine humaine).

Question 2. Quelle est l'applicabilité de la détection bactérienne dans notre pays ?

Comme expliqué ci-dessus, deux approches sont théoriquement possibles: une méthode lente par culture ou l'utilisation d'un test rapide juste avant la délivrance ou la transfusion.

En tenant compte de la somme des différents aspects, en ce compris l'approvisionnement pour les patients, l'amélioration potentielle de la sécurité microbienne des concentrés plaquettaires est comparable dans les deux stratégies (Montag, 2008). Chacune offre des avantages et des inconvénients: le gain apporté par chacune est comparable, ce qui signifie que l'une et l'autre peuvent être utilisées comme deux alternatives équivalentes (sauf pour les méthodes à faible sensibilité).

A noter cependant que dans le cas particulier des méthodes moléculaires, un désavantage de nombre d'entre elles est qu'elles peuvent détecter des bactéries mortes qui ne peuvent pas avoir de signification clinique dans ce contexte.

Cependant, si les établissements de transfusion belges ont une grande habitude d'utilisation des méthodes de culture (Bosly et al., 2007), l'implémentation de tests rapides va créer des problèmes logistiques difficiles à appréhender, parmi lesquels il faut évoquer les seuils de détection souvent élevés, les taux substantiels de faux positifs, indéterminés et non confirmés (Wood, 2010), l'organisation pratique, les problèmes d'approvisionnement et la répartition des responsabilités entre l'établissement de transfusion sanguine et l'institution hospitalière.

Question 3. Quels sont les avantages et inconvénients d'une détection de la contamination bactérienne par rapport aux techniques de réduction des pathogènes ?

Les données publiées actuellement suggèrent que la détection bactérienne par les méthodes disponibles peut présenter une fausse sensation de sécurité. En effet, on sait que l'approche par le dépistage, quelle que soit la méthode choisie, connaît une efficacité qui diminue avec le niveau de contamination bactérienne, tandis que la réduction des pathogènes est d'autant plus efficace que les niveaux de contamination sont faibles (Goodrich et al., 2009; Rood et al., 2011).

De plus, il ne faut cependant pas perdre de vue que la combinaison des procédures mises en place pour réduire la contamination dans les composants sanguins doit aussi être associée à des efforts pour promouvoir une pratique clinique plus appropriée et basée sur des preuves pour améliorer la reconnaissance et la gestion des sepsis post-transfusionnels, ainsi que le rapportage des réactions transfusionnelles et ce afin d'apporter un bénéfice réel au patient (Wood, 2010).

En conclusion, bien que les critères de sélection des donneurs aient été améliorés et les tests utilisés pour le dépistage aient permis de réduire considérablement les risques de transmission infectieuse par la transfusion (parmi lesquels il faut citer la contamination bactérienne), il existe différentes voies pour qu'un agent pathogène échappe à la détection et contamine le receveur. La période silencieuse, l'insuffisance de sensibilité de certains tests et l'émergence de nouveaux agents pathogènes en sont les principaux exemples. La réduction des pathogènes appliquée aux composants sanguins peut apporter une réponse à ces trois préoccupations, comme elle l'a fait pour les médicaments dérivés du plasma (Stramer et al., 2009; AuBuchon, 2010). Toutefois, les techniques utilisées induisent une détérioration métabolique des plaquettes, dont les conséquences ne sont pas encore suffisamment connues. Ce point sera réévalué à la lumière des nouvelles publications disponibles.

4. REFERENCES

- AFMPS. Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé. Hémovigilance en Belgique. Rapport annuel 2006. Bruxelles: AFMPS; 2007.
- AFMPS. Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé. Hémovigilance en Belgique. Rapport annuel 2007. Bruxelles: AFMPS; 2008.
- AFMPS. Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé. Hémovigilance en Belgique. Rapport annuel 2008. Bruxelles: AFMPS; 2010.
- AFSSAPS. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Rapport annuel Hémovigilance 2009. Saint-Denis: AFSSAPS; 2010.
- AuBuchon JP. Current status of pathogen inactivation methods. ISBT Science Series 2010;5:125-33.
- Benjamin RJ, Wagner SJ. The residual risk of sepsis: modelling the effect of concentration on bacterial detection in two-bottle culture system and an estimation of false negative culture rates. Transfusion 2007;47:1381-9.
- Benjamin RJ. Bacterial contamination of platelets: Clinical significant levels of bacteria detected despite culture screening during platelet manufacture. ISBT Berlin: presentation at Fenwal satellite meeting; 2010.
- Bosly A, Muylle L, Noens L, Pietersz R, Heim D, Hübner R, et al. Guidelines for the transfusion of platelets. Acta Clinica Belgica 2007;62:36-47.
- Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005;18:195-204.
- Burkhardt J, Wittmann G, Howe J, Michel P, Schramm W, Weinauer F. Klebsiella pneumoniae in platelet concentrates - a case report [abstract]. Transf Med Hemother 2005;32(Suppl 1):64.
- Cazenave JP. Les bactéries: je dépiste ou j'inactive ? Transfusion Clinique et Biologique 2007;14:81-5.

- Cheung KC, Di Berardino M, Schade-Kampmann G, Hebeisen M, Pierzchalski A, Bocsi J, et al. Microfluidic impedance-based flow cytometry. *Cytometry A*. 2010;77:648-66.
- CSH. Conseil Supérieur d'Hygiène. Guide d'indications transfusionnelles pour les plaquettes. Avis n° 8068. Bruxelles: CSH; 2005.
- CSS. Conseil Supérieur de la Santé. La réduction des pathogènes dans les concentrés plaquettaires. Avis n° 8390. Bruxelles: CSS; 2008.
- De Korte D, Curvers J, de Kort WL, Hoekstra T, van der Poel CL, Beckers EA, et al. Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion* 2006;46:476-85.
- Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K. Novel flow cytometry-based screening for bacterial contamination of donor platelet preparations compared with other rapid screening methods. *Clin Chem* 2009;55:1492-502.
- Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, Notary EP, Weiss JW, Fang CT, et al. Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004-2006). *Transfusion* 2007;47:1134-42.
- Eder AF, Kennedy JM, Dy BA, Notary EP, Skeate R, Bachowski G, et al. Limiting and detecting bacterial contamination of apheresis platelets: inlet-line diversion and increased culture volume improve component safety. *Transfusion* 2009;49:1554-63.
- EFS. Établissement Français du Sang. Rapport d'activité 2008. Paris: EFS; 2009.
- Goodrich RP, Edrich RA, Goodrich LL, Scott CA, Manica KJ, Hlavinka DJ, et al. The Antiviral and Antibacterial Properties of Riboflavin and Light: Applications To Blood Safety and Transfusion Medicine. Chapter 5. In: Silva E, Edwards AM, editors. *Flavins. Photochemistry and Photobiology*. Cambridge: RSC Publishing; 2006. p. 83-113.
- Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil SD. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion* 2009;49:1205-16.
- Heltberg O, Skov F, Gerner-Smidt P, Kolmos HJ, Dybkjaer E, Gutschik E, et al. Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicaemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. *Transfusion* 1993;33:221-7.
- Hogman CF, Fritz H, Sandberg L. Post-transfusion *Serratia marcescens* septicemia. *Transfusion* 1993;33:189-91.
- Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. *Clin Infect Dis* 2008;46:1214-20.
- Karo O, Wahl A, Nicol SB, Brachert J, Lambrecht B, Spengler HP, et al. Bacteria detection by flow Cytometry. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:947-53.
- Kerkhoffs JL, van Putten WL, Novotny VM, Te Boekhorst PA, Schipperus MR, Zwaginga JJ, et al. Clinical effectiveness of leucoreduced, pooled donor platelet concentrates, stored in plasma or additive solution with and without pathogen reduction. *Br J Haematol* 2010;150:209-17.
- Kovalenko V, Levin AE, inventors; Immunetics, Inc., assignee. Rapid peptidoglycan-based assay for detection of bacterial contamination. United States patent application 2010/0227353 A1. 2010 Sep 9.
- Larsen CP, Ezligini F, Hermansen NO, Kjeldsen-Kragh EJ. Six years' experience of using the BacT/ALERT system to screen all platelet concentrates, and additional testing of outdated platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. *Vox Sang* 2005;88:93-7.
- McCullough T, Vesole DH, Benjamin RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004;104:1534-41.
- Montag T. Strategies of bacteria screening in cellular blood components. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:926-32.
- Montag-Lessing T, Stoermer M, Hanschmann K-M. Report on the International Validation Study on Bacteria Standards (Transfusion-Relevant Bacterial Strain Panel) and Proposal for a validation study for enlargement of the transfusion-relevant bacterial strain panel.

- Geneva:WHO-Expert Committee on Biological Standardization; 2010. WHO/BS/10.2154. [accessed 2011 February 23.] Available from: http://www.who.int/biologicals/expert_committee/WHO_BS10.2154_Bacteria_Study_2.pdf
- Montag T, Störmer M, Schurig U, Brachert J, Bubenzer M, Sicker U, et al. Probleme der mikrobiellen Sicherheit bei neuartigen Therapien. Die Quadratur des Kreises. Bundesgesundheitsbl 2010;53:45-51.
 - Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, Naegelen C, Talon D. Transfusion-transmitted bacterial infection: residual risk and perspectives of prevention. Transfus Clin Biol 2003;10:192-200.
 - Motoyama Y, Yamaguchi N, Matsumoto M, Kagami N, Tani Y. Rapid and sensitive detection of viable bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bioimaging system. Transfusion 2008;48:2364-9.
 - Müller TH, Mohr H, Montag T. Methods for the detection of bacterial contamination in blood products. Clin Chem Lab Med 2008;46:933-46.
 - Murphy WG, Foley M, Doherty C, Tierney G, Kinsella A, Salami A, et al. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to produce safety. Vox Sang 2008;95:13-9.
 - Nussbaumer W, Allersdorfer D, Grabmer C, Rheinschmidt M, Lin L, Schönitzer D, et al. Prevention of transfusion of platelet components contaminated with low levels of bacteria: a comparison of bacteria culture and pathogen inactivation methods. Transfusion 2007;47:1125-33.
 - Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Detecting bacterial contamination in platelet products. Clin Lab 2006;52:443-56.
 - Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. Transf Apher Sci 2010;42:71-82.
 - Prowse C. Zero tolerance. Transfusion 2007;47:1106-9.
 - Rao PL, Strausbaugh LJ, Liedtke LA, Srinivasan A, Kuehnert MJ. Bacterial infections associated with blood transfusion: experience and perspective of infectious diseases consultants. Transfusion 2007;47:1206-11.
 - Ribault S, Harper K, Grave L, Lafontaine C, Nannini P, Raimondo A, et al. Rapid screening method for detection of bacteria in platelet concentrates. J Clin Microbiol 2004;42:1903-8.
 - Rieder R, Zavizion B. Monitoring the physiologic stress response: a novel biophysical approach for the rapid detection of bacteria in platelet concentrates. Transfusion 2008;48:2596-605.
 - Rieder R, Zhao Z, Nittayajarn A, Zavizion B. Direct detection of the bacterial stress response in intact samples of platelets by differential impedance. Transfusion 2011;51: *in press*.
 - Rood IG, Pettersson A, Savekoul PH, de Korte D. Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for eubacterial RNA detection in platelet concentrates. Transfusion 2010;50:1352-8.
 - Rood IGH, Pettersson A, Savekoul PHM, de Korte D. Performance and suitability of polymerase chain reaction for early detection of bacteria in platelet concentrates. Transfusion 2011;51: *in press*.
 - Rotman B, Cote MA. Application of a real-time biosensor to detect bacteria in platelet concentrates. Biochem Biophys Res Commun 2003;300:197-200.
 - Saranwong S, Ezuki S, Kawabata K, Kawano S, Ohto H. A noninvasive near infrared system for detection of platelet components contaminated with bacteria. Transfusion 2010;50:178-84.
 - Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, Deitenbeck R, Asmus J, Müller TH, et al. Comparison of three bacterial detection methods under routine conditions. Vox Sang 2007;92:15-21.
 - Schrezenmeier H, Walther-Wenke G, Müller TH, Weinauer F, Younis A, Holland-Letz T, et al. Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. Transfusion 2007;47:644-52.

- Snyder E, McCullough J, Slichter S, et al. Clinical safety of platelets photochemically treated with amotosalen HCl and ultraviolet A light for pathogen inactivation: the SPRINT trial. *Transfusion* 2005;45:1864-75.
- Störmer M, Brachert J, Gathof B, Goodrich R, Keil S, Marschner S, et al. Blood-Transfusion-Bacteria-Standards as a Tool for Development and Validation of Bacteria Screening Methods and Pathogen Reduction Technology in Platelet Concentrates [poster]. XXXI International Congress of the ISBT. Berlin, 26 June - 1 July 2010.
- Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009;49(Suppl 2):1S-29S.
- Taylor C (ed.), Cohen H, Mold D, Jones H, et al. on behalf of the Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Steering Group: The 2009 Annual SHOT Report; 2010 [accessed 2010 October 4]. Available from: <http://www.shotuk.org/wp-content/uploads/2010/07/SHOT2009.pdf>
- Te Boekhorst PA, Beckers EA, Vos MC, Vermeij H, van Rhenen DJ. Clinical significance of bacteriologic screening in platelet concentrates. *Transfusion* 2005;45:514-9.
- The Mirasol Clinical Evaluation Study Group. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion* 2010;50:2362-75.
- Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniels AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion* 2007;47:1643-50.
- Traore AN, Delage G, McCombie N, Robillard P, Heddle NM, Hyson C, et al. Clinical and laboratory practices in investigation of suspected transfusion-transmitted bacterial infection: a survey of Canadian hospitals. *Vox Sang* 2009;96:157-9.
- van der Meer PF, Kerkhoffs J-L, Curvers J, Scharenberg J, de Korte D, Brand A, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang* 2010;98:517-24.
- Védy D, Robert D, Gasparini D, Canellini G, Waldvogel S, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: pathogen detection and inactivation methods. *Hematol Rev* 2009;1:e5[22-8].
- Vollmer T, Hinse D, Kleesiek K, Dreier J. The Pan Genera Detection Immunoassay: a Novel Point-of-Issue Method for Detection of Bacterial Contamination in Platelet Concentrates. *J Clin Microbiol* 2010;48:3475-81.
- Vollmer T, Engemann J, Kleesiek K, Dreier J. Bacterial screening by flow cytometry offers potential for extension of platelet storage: results of 14 months of active surveillance. *Transfusion Medicine* 2011;21:*in press*.
- Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang* 2004;86:157-63.
- Walther-Wenke G, Doerner R, Montag T, Greiss O, Hornei B, Knels R, et al. Bacterial contamination of platelet concentrates prepared by different methods: results of standardised sterility testing in Germany. *Vox Sang* 2006;98:177-82.
- Webert KE, Csetri CM, Hannon J, Lin Y, Pavenski K, Pendergrast JM, et al. Proceedings of a consensus conference: pathogen inactivation - making decisions about new technologies. *Transfus Med Rev* 2008;22:1-34.
- Wood E. Blood safety: bacterial screening of blood products. *ISBT Science Series* 2010;5:46-51.
- Yazer MH, Stapor D, Triulzi DJ. Use of the RQI test for bacterial screening of whole blood platelets. *Am J Clin Pathol* 2010;133:564-8.
- Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, Downes KA, Morrissey AM, Bajaksouzian S, et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion* 2006;46:719-30.
- Yomtovian R, Tomasulo P, Jacobs MR. Platelet bacterial contamination: assessing progress and identifying quandaries in a rapidly evolving field. *Transfusion* 2007;47:1340-6.

5. COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Tous les experts ont participé *à titre personnel* au groupe de travail. Les noms des membres et experts du CSS sont annotés d'un astérisque *.

Les experts suivants ont participé à l'élaboration de l'avis:

BENOIT Yves	hématologie oncologie pédiatrique	UGent
DAUBE George*	microbiologie alimentaire	ULg
DENEYS Véronique*	transfusion	Service du Sang, Croix Rouge de Belgique; UCL
FERRANT Augustin*	hématologie clinique	UCL
LAMBERMONT Micheline*	transfusion	ULB; Service du Sang, Croix Rouge de Belgique
MATHYS Esther	sang et dérivés sanguins; virologie	ISP
MUYLLE Ludo*	sang, tissus et cellules	UA; UZA; AFMPS
PEERLINCK Kathelijne	maladies de la coagulation et des vaisseaux sanguins	KUL
SELLESLAG Dominik	médecine interne; hématologie	AZBrugge
SIMON Anne*	microbiologie médicale	UCL
SZABO Bertrand	transfusion	Cliniques Reine Astrid Malmédy
THOMAS Isabelle*	virologie	ISP
VAN DER LINDEN Philippe	anesthésiologie	CHU Brugman

Les personnes suivantes ont été entendues:

COENE José	transfusion	Dienst voor het Bloed, Rode Kruis – Vlaanderen
------------	-------------	--

Le groupe de travail a été présidé par Mme Véronique DENEYS et le secrétariat scientifique a été assuré par Roland HÜBNER.

Au sujet du Conseil Supérieur de la Santé (CSS)

Le Conseil Supérieur de la Santé est un service fédéral relevant du SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement. Il a été fondé en 1849 et rend des avis scientifiques relatifs à la santé publique aux ministres de la santé publique et de l'environnement, à leurs administrations et à quelques agences. Ces avis sont émis sur demande ou d'initiative. Le CSS ne prend pas de décisions en matière de politique à mener, il ne les exécute pas mais il tente d'indiquer aux décideurs politiques la voie à suivre en matière de santé publique sur base des connaissances scientifiques les plus récentes.

Outre son secrétariat interne composé d'environ 25 collaborateurs, le Conseil fait appel à un large réseau de plus de 500 experts (professeurs d'université, collaborateurs d'institutions scientifiques), parmi lesquels 200 sont nommés à titre d'expert du Conseil. Les experts se réunissent au sein de groupes de travail pluridisciplinaires afin d'élaborer les avis.

En tant qu'organe officiel, le Conseil Supérieur de la Santé estime fondamental de garantir la neutralité et l'impartialité des avis scientifiques qu'il délivre. A cette fin, il s'est doté d'une structure, de règles et de procédures permettant de répondre efficacement à ces besoins et ce, à chaque étape du cheminement des avis. Les étapes clé dans cette matière sont l'analyse préalable de la demande, la désignation des experts au sein des groupes de travail, l'application d'un système de gestion des conflits d'intérêts potentiels (reposant sur des déclarations d'intérêt, un examen des conflits possibles, un comité référent) et la validation finale des avis par le Collège (ultime organe décisionnel). Cet ensemble cohérent doit permettre la délivrance d'avis basés sur l'expertise scientifique la plus pointue disponible et ce, dans la plus grande impartialité possible.

Les avis des groupes de travail sont présentés au Collège. Après validation, ils sont transmis au requérant et au ministre de la santé publique et sont rendus publics sur le site internet (www.css-hgr.be), sauf en ce qui concerne les avis confidentiels. Un certain nombre d'entre eux sont en outre communiqués à la presse et aux groupes cibles parmi les professionnels du secteur des soins de santé.

Le CSS est également un partenaire actif dans le cadre de la construction du réseau EuSANH (European Science Advisory Network for Health), dont le but est d'élaborer des avis au niveau européen.

Si vous souhaitez rester informé des activités et publications du CSS, vous pouvez vous abonner à une *mailing-list* et/ou un *RSS-feed* via le lien suivant: <http://www.css-hgr.be/rss>.