

# Bactéries transmissibles par le sang

Cécile Meex  
Service de Microbiologie clinique  
CHU Liège

Master en Médecine Transfusionnelle 2016-2017  
Module 8 : Maladies transmissibles par le sang  
06-12-2016

- **Produits sanguins labiles (PSL) +++**
- Produits sanguins stables (médicaments dérivés du sang) –
- **Mécanismes:**
  - Immunologiques
  - Non immunologiques:
    - **Accidents infectieux**
    - Accident de surcharge

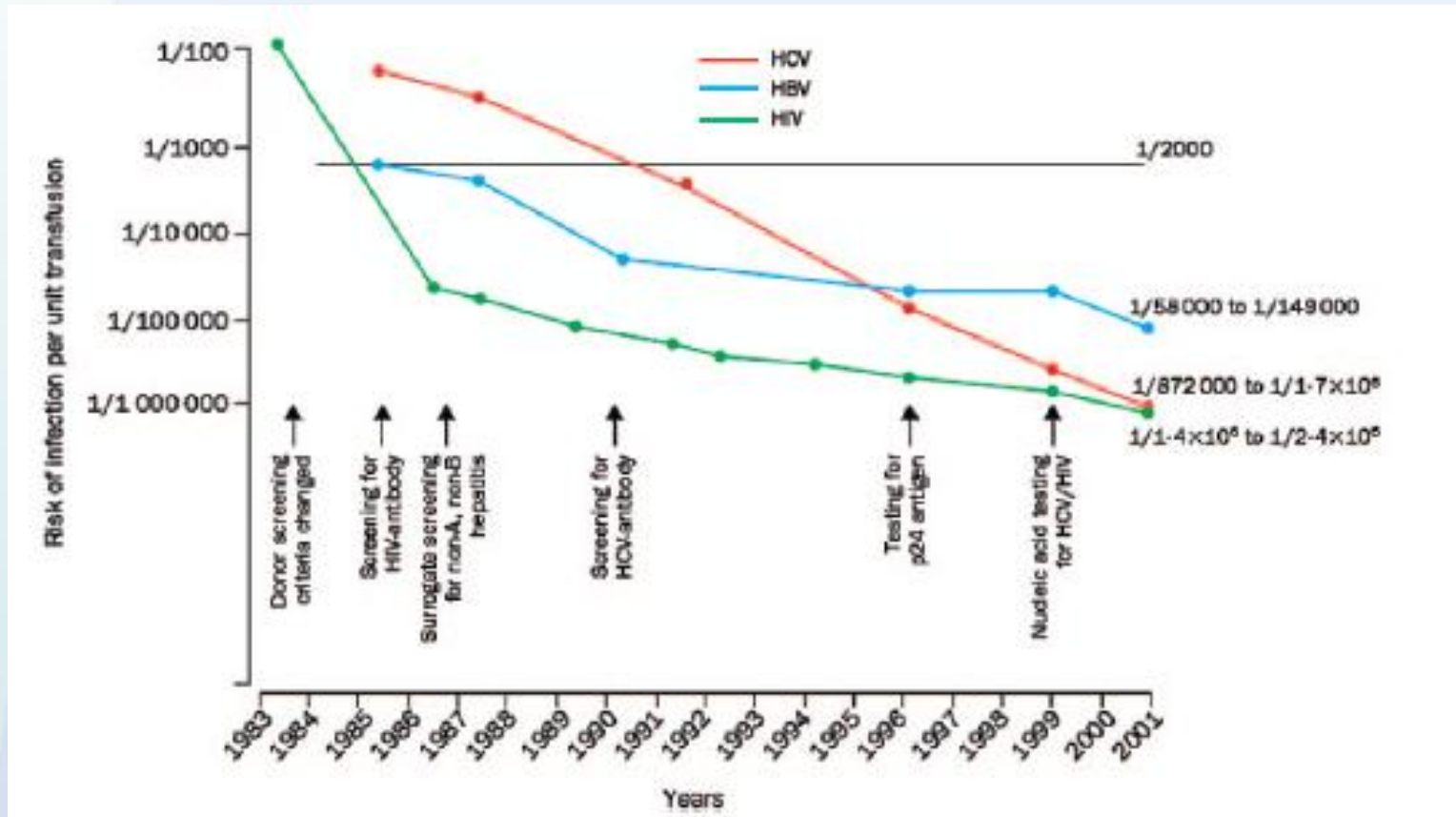


- Hyperthermie
- Agitation
- Sensation de chaleur
- Douleurs lombaires ou thoraciques
- Hypo/hypertension
- Nausées ou vomissements
- Diarrhées
- Bouffées de chaleur
- Dyspnée
- Pâleur
- Sensation de prurit ou d'urticaire
- Saignements
- Tachycardie

- **Arrêt immédiat** de la transfusion, appel du médecin
- Maintien d'une voie d'abord pour perfusion d'un soluté
- **Examen clinique**: T°, pression artérielle, fréquence cardiaque, urines
- Mesures thérapeutiques immédiates (réanimation) si nécessaire

- **Saisie de l'unité en cours de transfusion, des tubes de sang disponibles et des contrôles effectués**
- **Transmission des unités de sang**
  - au laboratoire de bactériologie en cas de suspicion d'accident par contamination bactérienne
  - au laboratoire d'IH en cas de suspicion d'accident immuno-hémolytique
- **Déclaration dans les 48h au réseau d'hémovigilance**

- Maladies virales
- Parasitoses
- **Infections bactériennes**
  - Risque faible mais connu
  - Les plus fréquentes actuellement
    - 50 à 250 fois plus élevé que les risques combinés de transmission du VIH, de l'hépatite B et de l'hépatite C et des HTLV-1 et -2
  - Les plus léthales
    - Choc septique ou endotoxinique immédiat et grave



## Concentrés de globules rouges



- Conservation entre **2-6°C**
- 0 à 0.6% de poches contaminées
  - peu de prolifération bactérienne à basse T°.
- **Sepsis post-transfusion rare** mais
  - Sévère
  - Rapide
    - Fièvre, frissons pendant ou juste après la transfusion
- 1 accident mortel par million d'unités distribuées\*

\* Etude Bacthem, France (1996-1998)

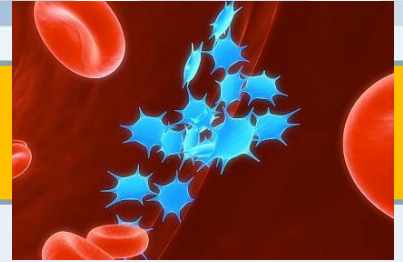


## Concentrés de globules rouges



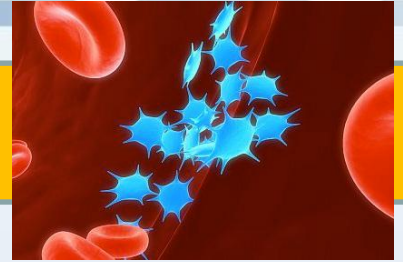
- Sepsis causés dans 80% des cas par bactéries psychrophiles (capables de pousser à T° frigo)
- **Bactéries à Gram négatif majoritaires:**
  - *Yersinia enterocolitica* 46%
    - Capable de se multiplier à 4°C
    - Globules rouges = milieu favorable : utilisation citrate et apport de fer
    - Production d'endotoxine
  - *Pseudomonas spp.* 25%
  - *Serratia spp.* 11%
- Agents identiques en cas de sepsis et d'accidents mortels

## Concentrés plaquettaires



- Conservation entre **20 et 24°C**
- 1 sur  $\pm$  1500 unités contaminées (donneur unique)
  - **conditions de croissance idéales pour un large spectre de bactéries**
- Sepsis cliniquement apparent: 1 sur 15 000 unités
  - Plus fréquent chez patients sévèrement immunocompromis
- 1 accident mortel sur 50 000-500 000 unités

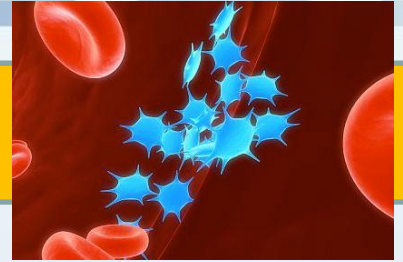
## Concentrés plaquettaires



### – En Belgique:

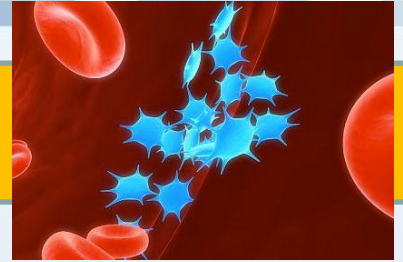
- 5 réactions septiques signalées dans le cadre de l'hémovigilance durant la période 2006 – 2008
- Durant cette période, 193.000 concentrés plaquettaires ont été administrés (soit 1:38.000 réactions).

## Concentrés plaquettaires



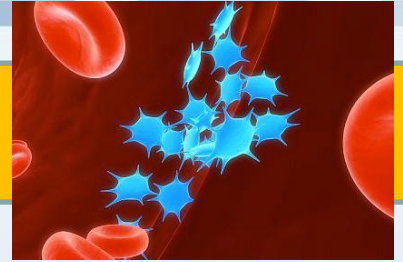
- Les **bactéries à Gram positif** sont majoritairement impliquées en cas de **sepsis**:
  - *Staphylococcus sp.* 42%
  - *Streptococcus sp.* 12%
  - *Bacillus sp.* 9%
- Les **bactéries à Gram négatif** sont à l'origine de la majorité des **cas fatals**.
  - *Klebsiella spp.* 17%

## Concentrés plaquettaires



- **Présentation clinique variable**
  - Aiguë ou retardée
- **Sévérité du sepsis dépend de:**
  - **nombre de CFU transfusés**
    - Seuil (réaction grave):  $10^5 - 10^6$  CFU/ml
  - **type de bactérie concernée +++**
  - taux de prolifération bactérienne
  - phase de latence
  - **paramètres liés au patient**

## Concentrés plaquettaires



- Transfusion principalement chez sujets immuno-déprimés, avec maladie sous-jacente lourde (patients onco, hémato...)
- **Sepsis dû à la transfusion de plaquettes contaminées peu passer inaperçu**

## Plasma et cryoprécipité

- Conservation au **congélateur**
  - Rarement associé à contamination bactérienne
- Contamination décrite par bactéries de l'environnement aquatique si décongélation en bains d'eau: *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*...
- Privilégier micro-onde, plaque chauffante...

- **Désinfection incomplète de la peau/Cavernes**
  - **Bactéries commensales de la peau:**
    - Cocci Gram positif: *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus...*
    - Bacilles Gram positif: *Bacillus cereus*, *Corynebacterium...*
    - Anaérobies: *Propionibacterium...*
  - **Pas de multiplication à 2-6°C**
  - **Multiplication rapide à 20-24°C** (T° de conservation des plaquettes)





- **Donneurs asymptomatiques avec bactériémie transitoire ou chronique**
  - *Yersinia enterocolitica*, bactéries de la flore oropharyngée après lavage de dents, visite chez le dentiste
  - Ostéomyélite à *Salmonella sp...*
- **Processus de fabrication du produit sanguin**
  - Bactéries de l'environnement aérien et des surfaces
  - *Serratia, Enterobacter, Pseudomonas*
- **Habitudes de vie du donneur**
  - *Clostridium perfringens*

Cependant, fréquemment:

**Source de contamination non identifiée**



## 1. Eviter la contamination

### – Screening des donneurs

- Questionnaires
- Peu spécifique
- Manque de sensibilité

### – Préparation de la peau

- Diminue la charge bactérienne cutanée
- ! Inaccessibilité des microorganismes présents dans les glandes sébacées et les follicules pileux
- Iodine / Povidone iodine
- Chlorhexidine
- Alcool isopropylique

## 1. Eviter la contamination

- **Déviation du prélèvement sanguin initial**
  - Diminution significative de la contamination bactérienne < peau
  - Peu d'incidence sur cas fatals car causés majoritairement par bactéries à Gram négatif
- **Concentrés d'aphérèse (donneur unique) VS concentrés dérivés de sang complet (WBPCs = mélange)**
  - Risques équivalents

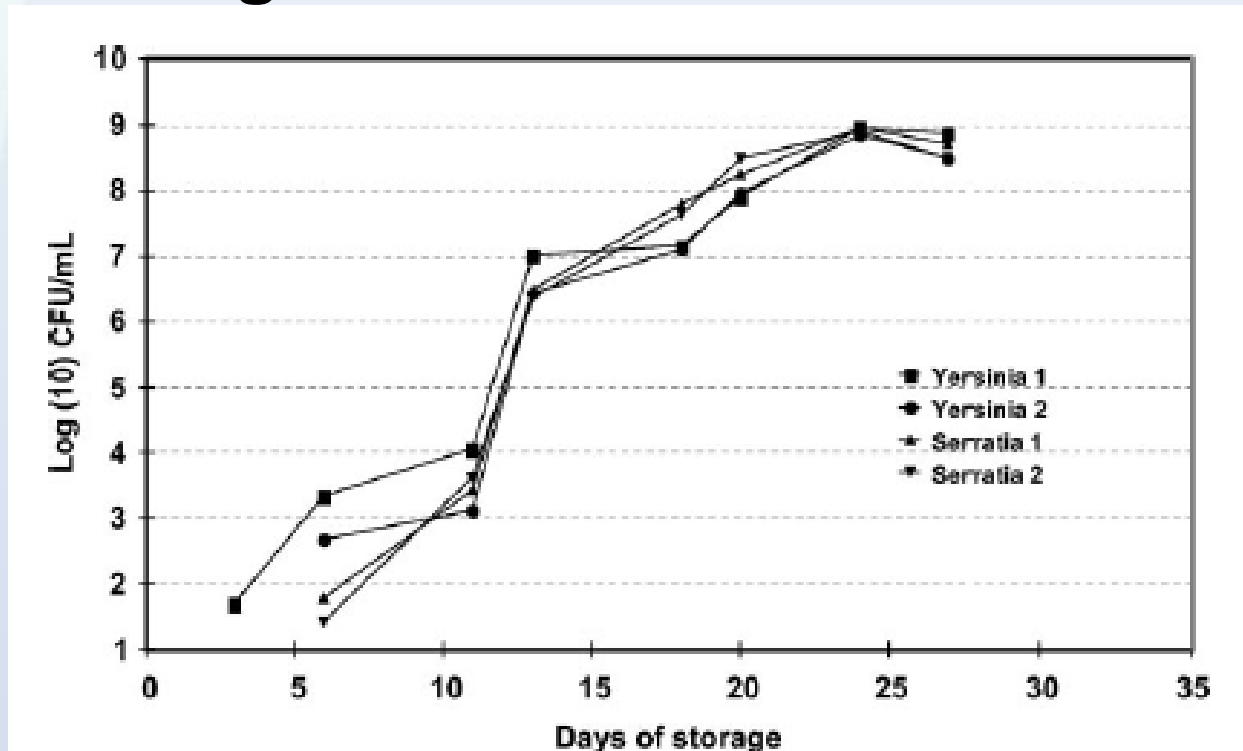
## 2. Détection bactérienne

### – Timing de détection

- Charge bactérienne faible voire indétectable le jour de collection de l'échantillon
- Multiplication lors de la conservation, surtout à 20-24°C

## 2. Détection bactérienne

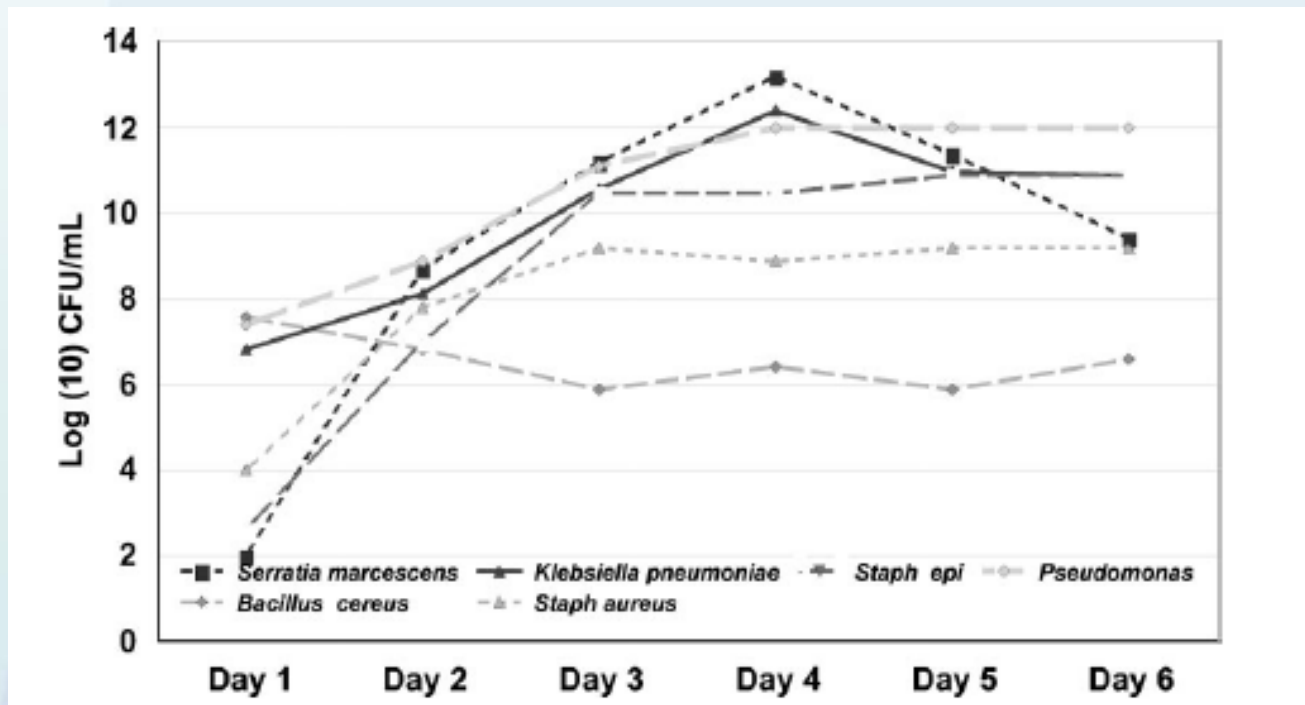
### – Timing de détection



Courbe de croissance bactérienne dans concentré de globules rouges contaminés in vitro.  
Brecher *et al.* CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 2005, p. 195–204

## 2. Détection bactérienne

### – Timing de détection



Courbe de croissance bactérienne dans concentré plaquettaire contaminés in vitro.  
Brecher *et al.* CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 2005, p. 195–204

## 2. Détection bactérienne

### – Timing de détection

- Méthodes de détection sensibles (ex: culture) recommandées dans les 1 ou 2 jours suivants la collection  
→ Mise en culture le jour de collection: risque de faux négatifs
- Méthodes moins sensibles à réserver aux heures précédant la transfusion

**>< contamination virale: détectée  
immédiatement par mise en évidence du  
virus ou de la réponse immunitaire (Ac)**



## 2. Détection bactérienne

- Culture bactérienne: Systèmes automatisés
  - BacT/ALERT; bioMérieux



- » Culture en milieu liquide
- » Détection de croissance automatisée par senseur colorimétrique
- » Bactéries aéro et anaérobies, levures, champignons
- » Seuil de sensibilité 1-10 CFU/ml
- » Inoculation recommandée après  $\geq 1$  jour de conservation
- » Positivité en général dans les 12-26h (excepté bactéries type *P.acnes*)




## 2. Détection bactérienne

- Culture bactérienne: Systèmes automatisés
  - Pall Bacterial Detection System


- mesure de la consommation de l'oxygène du milieu par les bactéries
- mise en culture 24 heures après le prélèvement
- sensibilité : 1 à 10 CFU/mL
- spécificité : 100 %.
- Pas de détection des bactéries anaérobies

**Pall BDS System (First Generation)**

Second Generation System licensed March 2004



Pall BDS Oxygen Analyzer  
Measures changes in the percent oxygen in air due to bacterial growth in the sample pouch



Pall BDS Sample Set  
A. Blood cell retaining filter; B. Sample port; C. Sample pouch; D. Plasma fill line; E. SPS bacterial enhancer tablet

©Pall Corp. Reproduced with permission. 2004.

## 2. Détection bactérienne

- **Culture bactérienne: Systèmes automatisés:**
- Problèmes et considérations
  - Pour les WBPCs, culture possible uniquement si stockage après mélange
  - Signification clinique des bactéries anaérobies telles *Propionibacterium acnes*?
  - Durée d'incubation des cultures avant libération des unités de plaquettes
  - Systèmes non validés pour détection des bactéries: validation interne requise.

## 2. Détection bactérienne

- **Culture bactérienne: Systèmes automatisés**
  - **Ne permettent pas de prévenir la transfusion de tous les composants contaminés.**
    - 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).
  - **Limites:**
    - faux positifs qui mènent au rejet de composants sanguins conformes
    - faux négatifs qui peuvent aboutir à des sepsis transfusionnels

## 2. Détection bactérienne

### – Détection rapide avant transfusion

- Coloration de Gram/ Acridine orange

Sensibilité :  
 $10^4$  à  $10^5$   
CFU/ml

- Consommation du glucose (tigettes)

- Détermination du pH

- Swirling test

Sensibilité faible:  
 $10^6$  à  $10^7$   
CFU/ml

## 2. Détection bactérienne

### – Détection rapide avant transfusion

#### ▪ Swirling test

- Apparence perlée des plaquettes quand une unité est inversée
- Due à une augmentation locale de turbidité quand les plaquettes asymétriques se superposent dans le flux de liquide
- Perte de ce swirling en cas de contamination bactérienne
  - » pH diminue
  - » Plaquettes asymétriques deviennent sphériques

Avantage: ce test ne nécessite pas de prélèvement dans la poche

## 2. Détection bactérienne

- Détection rapide avant transfusion
  - Swirling test

Swirl Negative



©Pall Corp. Reproduced with permission. 2004.



Contaminated Platelets



Reproduced with permission. 2004.



## 2. Détection bactérienne

### – Détection rapide avant transfusion

#### ▪ Cytométrie en phase solide (Scansystem)

- marquage fluorescent des acides nucléiques bactériens, suivi de la détection par scannage au laser
- Elimination des plaquettes préalable
- Bonne sensibilité:  $10^1$  à  $10^2$  CFU/ml
- Rapide
- Difficilement applicable en routine de transfusion



## 2. Détection bactérienne

### – Détection rapide avant transfusion

#### ▪ Cytométrie de flux

- fluorochrome traverse la membrane des bactéries vivantes
- scindé par des estérases cellulaires produisant ainsi un signal fluorescent
- distinction des bactéries vivantes de celles qui ne le sont plus
- Bonne sensibilité: 150 CFU/ml
- Rapide
- Nécessite un cytomètre de flux

## 2. Détection bactérienne

- **Détection rapide avant transfusion**
  - **Tests rapides immunologiques**
    - Immunodiffusion:

- » anticorps anti-lipopolysaccharides pour la détection des bactéries à coloration de Gram négative
- » anticorps dirigés contre l'acide lipotéichoïque pour la détection des bactéries à coloration de Gram positive
- » Sensibilité:  $10^4$  à  $10^6$  CFU/ml selon les espèces (Gram positifs mieux détectés).



## 2. Détection bactérienne

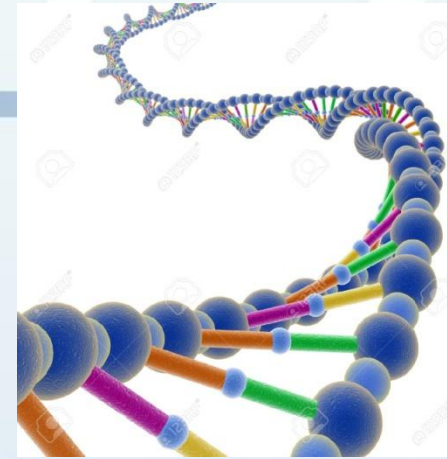
### – Biologie moléculaire

#### ▪ Sonde dirigée sur rRNA

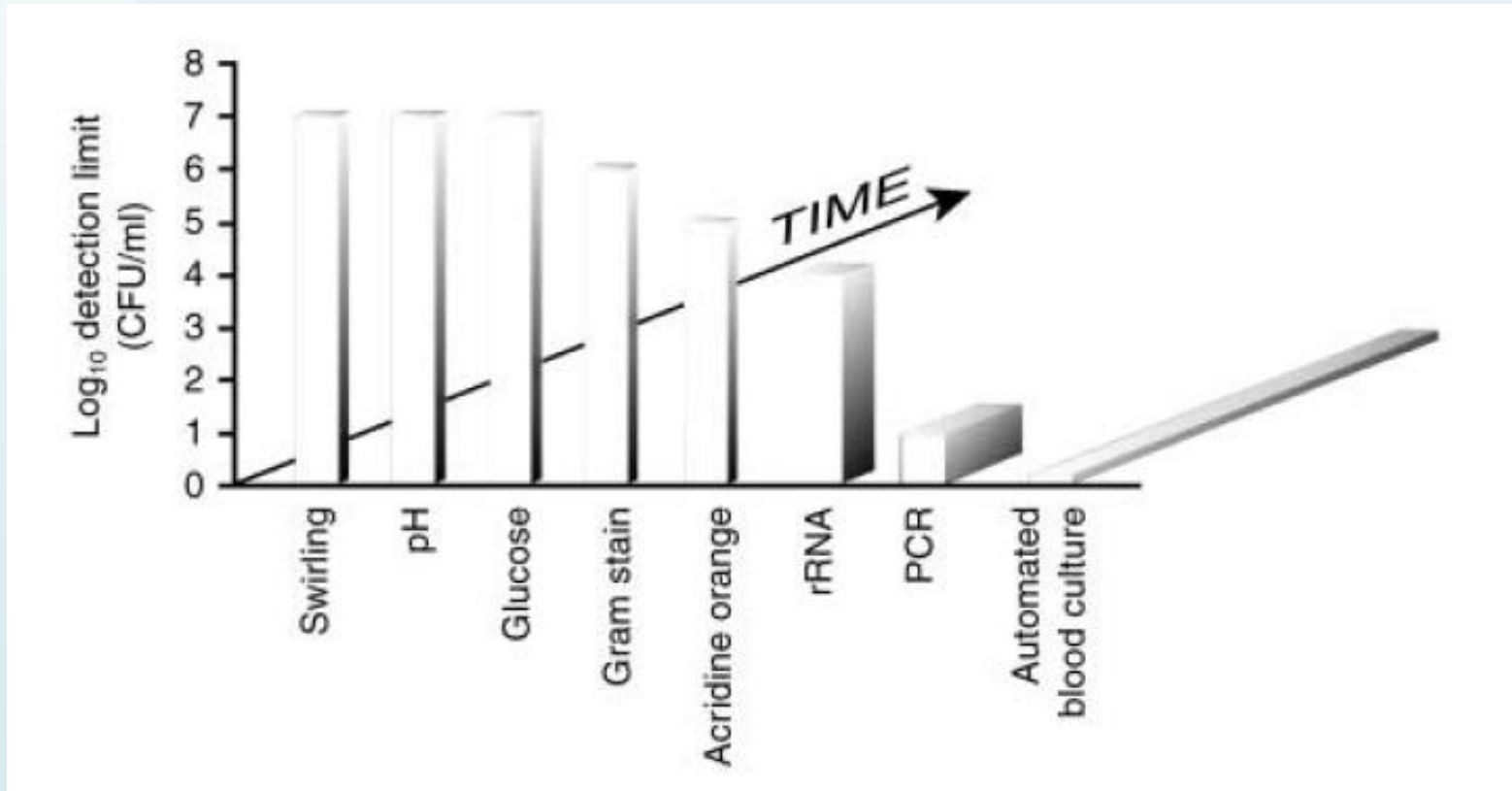
- ARN16s non amplifié présent en  $\pm 5000$  copies/cellules
- Détection chémiluminescente
- Sensibilité  $>10^4$  CFU/ml

#### ▪ PCR RNA16s ou PCR spécifiques pour un nombre limité de microorganismes

- Sensible: 1-10 CFU/ml
- Rapide
- Complexité des manipulations
- Contamination/Interférences



## 2. Détection bactérienne



Limites de détection et délais de différents tests de détection de contamination bactériennes - Wagner et al. *Vox Sanguinis* (2004) **86**, 157–163

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

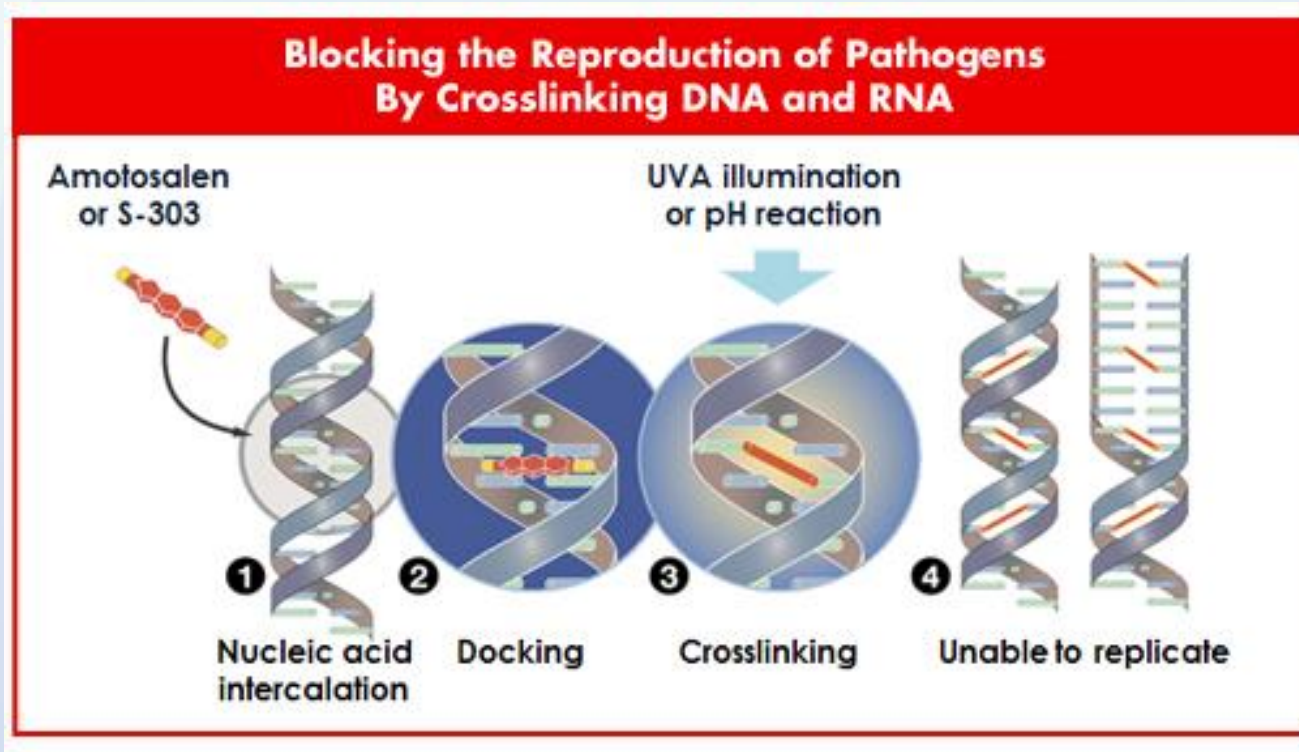
## 3. Réduction bactérienne

### – Sensibilisateurs photoactifs

- Réduction des virus, parasites, bactéries
- Ex: psoralen combiné avec traitement photochimique → liaisons permanentes dans le DNA et RNA
- Les plaquettes restent aussi efficaces dans le traitement des saignements mais faible réponse post-transfusionnelle
- Résistance à l'inactivation photochimique des microorganismes capables de sporuler
- Mutagénicité? Tératogénicité?

## 3. Réduction bactérienne

### – Sensibilisateurs photoactifs

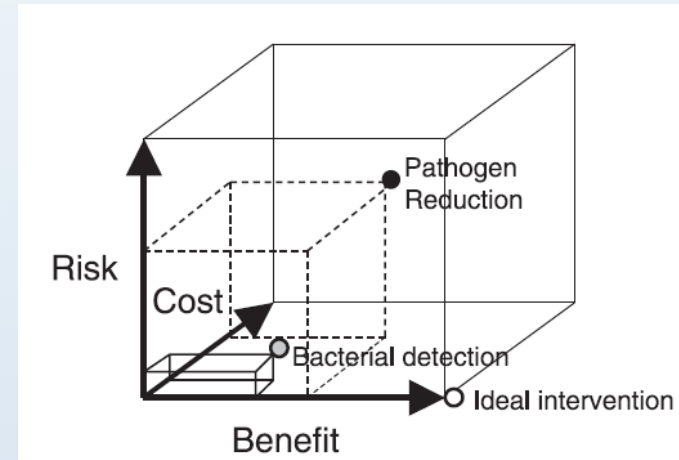


## 4. Inhibition de croissance

- **Ajout d'antibiotiques aux composants sanguins**
  - Risque accru de réactions médicamenteuses
  - Risque de développement de résistance aux AB



- **Politique appliquée par chaque pays dépend de:**
  - **Prévalence du risque infectieux**
  - **Importance estimée de la contamination bactérienne**
  - **Balance entre**
    - Réduire **les risques**
    - Augmenter **les coûts** et risques liés au méthodes de screening bactérien ou de réduction bactérienne



Wagner et al. *Vox Sanguinis* (2004)  
86, 157–163

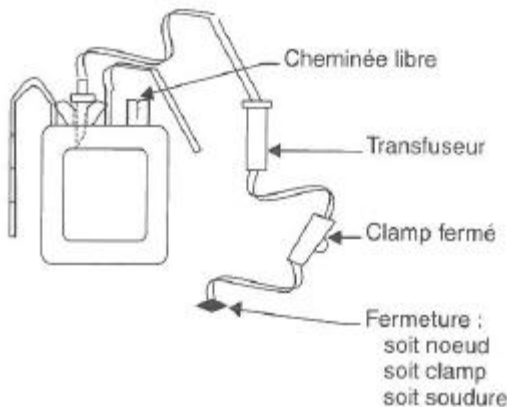
- **En Belgique**

- **La détection de la contamination bactérienne est obligatoire 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

- **En cas d'incident transfusionnel d'origine bactérienne:**
  - **Prise en charge de la poche pour examen bactériologique**
    - Acheminement au laboratoire dans les 2h à T° ambiante, sinon +4°C.
    - Dans son emballage d'origine avec cheminée libre et tubulure clampée sans aiguille
    - Traitement par du personnel spécifiquement formé
  - **S'assurer que 2 paires d'hémocultures ont été prélevées chez le patient à 1h d'intervalle**

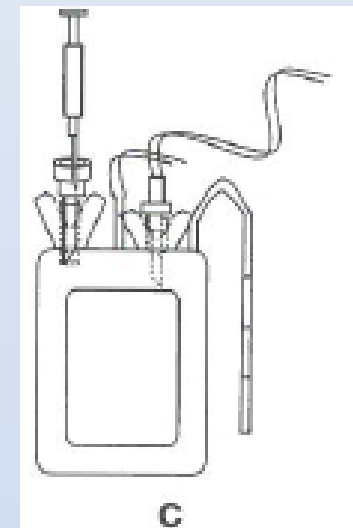
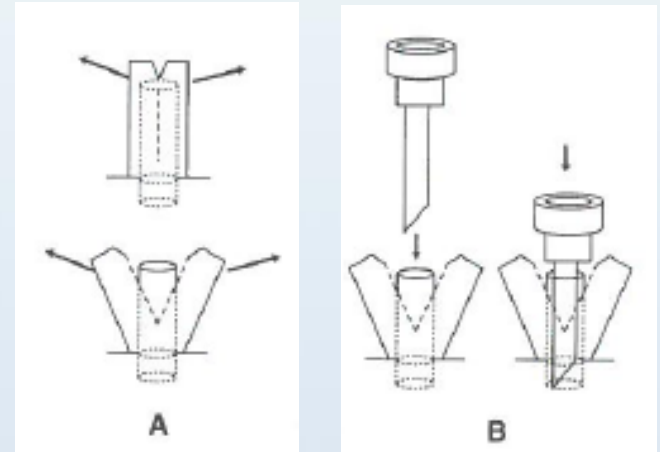
- **Prélèvement**

- Sous **poste de sécurité microbiologique**
  - Désinfecté + champ stérile
- Matériel à usage unique
- Hygiène des mains et port de gants par l'opérateur



- **Prélèvement**

- Désinfecter des surfaces à ponctionner par alcool iodé 1% ou désinfectant équivalent
- Dégager la cheminée de connexion, la désinfecter et introduire le dispositif de prélèvement
- Après désinfection de l'embout, prélever à l'aide d'une seringue de 10ml le contenu de la poche pour examen microscopique et ensemencement des milieux.



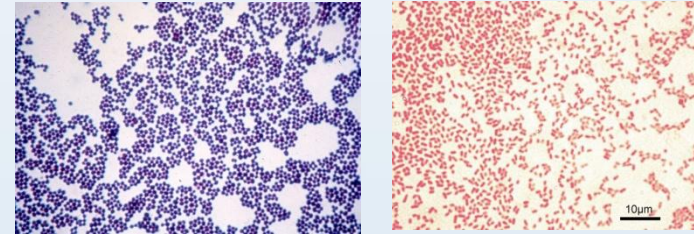
- **Prélèvement**

- En cas de poche vide:

- rincer la poche en injectant 20 ml de solution isotonique stérile
    - Procéder comme décrit précédemment

- **Examen microscopique**

- Coloration de **Gram**
- Autres colorations...



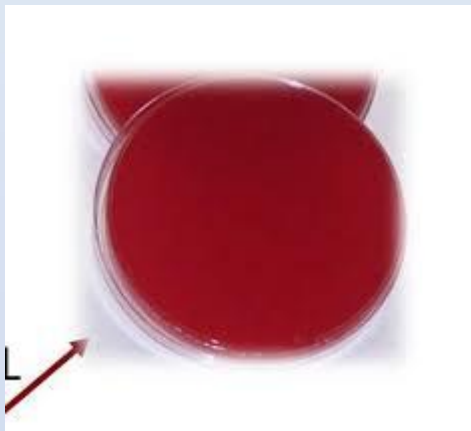
## **Prévenir les services concernés si positif**

- Service clinique concerné
- Service de transfusion sanguine
- Hémovigilance

- **Mise en culture**

- **Milieux solides:** 0.1 ml du contenu sur:

- **Gélose au sang** de cheval ou mouton → 35-37°C en **aérobiose** pendant 48h
    - **Gélose au sang** de cheval ou mouton → 35-37°C en **anaérobiose** pendant 5 jours





- **Mise en culture**

- **Milieus liquides:** 5 à 10 ml du contenu dans:

- **2 flacons pour hémocultures aérobie et anaérobie**, incubés à 35-37°C pendant 10 jours



- **Résultats**

- **Milieux solides:**

- Identification
    - Antibiogramme

- **Milieux liquides:**

- Examen microscopique
    - Repiquage sur:
      - Flacon aérobie:
        - » gélose au sang à 35-37°C en aérobie pendant 48h
        - » gélose Sabouraud à 20-25°C pendant 5 jours
      - Flacon anaérobie:
        - » Gélose au sang à 35-37°C en aérobie pendant 48h
        - » Gélose au sang à 35-37°C en anaérobie pendant 5 jours
    - Identification + antibiogramme

## **Prévenir les services concernés si +**

- Service clinique concerné
- Service de transfusion sanguine
- Hémovigilance

- **Risque de contamination variable selon les produits:**
  - **Concentrés plaquettaires >>> concentrés de globules rouges**
- **Stratégies de prévention choisies selon les pays**
  - **Recommandations du CSS en Belgique pour les concentrés plaquettaires:**
    - **Détection bactérienne des concentrés plaquettaires**
    - **Depuis 2009: Processus photochimique de réduction des pathogènes par l'hydrochlorure d'amotosalène**
- **Parmi les microorganismes en cause, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries et *Yersinia enterocolitica* sont les plus dangereux**