

La déleucocytation et son apport pour la sécurité transfusionnelle

F. BEN AHMED,
N. SAID,
C. TOUNSI

Centre Militaire de
Transfusion Sanguine

Résumé : La déleucocytation est la soustraction des leucocytes des produits sanguins labiles. Lorsqu'elle est réalisée dans des conditions rigoureuses, elle élimine plus de 99,99% des leucocytes de départ.

Cette déleucocytation évite essentiellement les réactions de frisson-hyperthermie et l'alloimmunisation anti HLA de même que la transmission de virus et de bactéries à développement intra leucocytaire.

Elle contribue ainsi à améliorer la qualité et la sécurité des produits sanguins labiles.

Généralisée en Occident depuis plusieurs années pour tous les produits sanguins labiles, la déleucocytation est une méthode encore peu utilisée en Tunisie.

Mots clés : *Leucocytes, Produits sanguins labiles, Complications transfusionnelles, Sécurité transfusionnelle.*

Introduction

La Transfusion des produits sanguins labiles (PSL) équivaut à une greffe de tissu liquide. Ceci est d'autant plus vrai pour les produits cellulaires, à savoir les concentrés de globules rouges (CGR) et de plaquettes (CSP).

En matière de produits sanguins cellulaires et jusqu'il y a une trentaine d'années, seuls les antigènes érythrocytaires, en particulier ABO et Rhésus, tenaient le premier plan et étaient respectés tout le temps et partout.

Par la suite, un regain d'intérêt pour les autres groupes sanguins s'est manifesté avec la systématisation de la recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) et de la compatibilité suivie du phénotypage des concentrés globulaires.

Les antigènes leucoplaquettaires n'ayant intéressé la transfusion des produits sanguins labiles que pendant les années 80, l'émergence de nouveaux virus (HIV, HTLV) a fini par persuader les autorités médicales à approfondir la déleucocytation et la généraliser dans certains pays (France, avril 1998).

Principe

La déleucocytation par filtration consiste à préparer des produits sanguins dépourvus de leucocytes et concerne pour l'essentiel, les concentrés globulaires et les concentrés plaquettaires.

Lorsqu'elle est réalisée dans des conditions optimales,

elle permet de diminuer d'un facteur 10^4 à 10^5 la charge initiale d'un produit en leucocytes et de réduire celle-ci en une quantité inférieure à 1 million de leucocytes par unité ($1 \times 10^6/u$), norme définissant le qualificatif «déleucocytés». Exprimée en pourcentage, cette filtration élimine 99,99% des leucocytes de départ (norme internationale) (7) Les normes tunisiennes (6) préconisent une concentration en leucocytes inférieure à 1.10^9 par CGR et inférieure à 10^6 par unité de CSP ou de concentré plaquettaire d'aphérèse (CPA).

Deux principales méthodes sont actuellement utilisées par les établissements de transfusion sanguine (E.T.S), l'une est la filtration dite par connexion stérile d'un filtre, la seconde est dite en ligne (1,2).

La déleucocytation est réalisée par le passage du produit à travers un réseau de fibres fortement comprimées contenues dans un boîtier en plastique.

Un certain nombre d'études a montré que l'efficacité de la déleucocytation dépendait non seulement des caractéristiques physico-chimiques des matériaux constituant les filtres, mais également de la composition cellulaire et plasmatique du CGR (10).

Importance de la déleucocytation (3,5)

L'élimination des leucocytes (5 à $7000/mm^3$ de sang) contribue à réduire plusieurs phénomènes et facteurs de

risque pathologiques :

- Les réactions fébriles non hémolytiques : les leucocytes utilisent de nombreux messages chimiques tels que les cytokines et l'histamine. Au cours de la conservation du produit sanguin, les leucocytes libèrent ces médiateurs. Lors de la transfusion, ceux-ci en s'accumulant, peuvent provoquer une réaction de type frisson-hyperthermie.

- L'alloimmunisation anti HLA qui en s'installant, peut être à l'origine d'un état réfractaire à la transfusion de plaquettes et responsable du rejet de greffes.

- Le risque de transmission virale avec diminution de la charge virale ; sont concernés en premier lieu, les virus strictement intra leucocytaires tels que le CMV, le HTLV et l'EBV. (4)

- Le risque bactérien, les leucocytes phagocytaires pouvant contenir des bactéries (notamment yersinia enterocolitica).

- Le risque hypothétique de transmission des prions.

Ainsi la déleucocytation, en ôtant presque la totalité des leucocytes, contribue à améliorer de manière significative la qualité et la sécurité des PSL.

Les techniques actuelles (8)

La principale technique utilisée est la filtration par passage du produit à déleucocyter à travers un tamis de fibres très serrées et comprimées dans un boîtier en plastique. Ce boîtier, monté en entrée et sortie avec tubulures de PVC et poche de recueil, est conditionné unitairement, puis stérilisé soit en chaleur humide, soit à l'oxyde d'éthylène, soit par irradiation gamma.

Il existe des filtres à déleucocyter pour les concentrés globulaires, pour les concentrés plaquettaires, et pour le sang total.

Les fabricants proposent deux présentations :

- une, dite «connectable» nécessitant la réalisation d'une connexion stérile entre le filtre et le produit à déleucocyter,
- une autre, dite «en ligne» directement intégrée dans le dispositif de prélèvement et ne nécessitant pas de connexion stérile.

Ultérieurement sont apparus des dispositifs de prélèvement des concentrés de plaquettes d'aphérèse, qui contiennent un

très faible taux de leucocytes résiduels, permettant de s'affranchir de la filtration, (technique d'elutriation). Le produit est dans ce cas déjà déleucocyté lors de son prélèvement (dispositif LRS).

Principales étapes de la déleucocytation connectable (9)

Plusieurs étapes successives sont nécessaires à la filtration :

- Connexion du filtre au produit sanguin à déleucocyter
- Amorçage du filtre par application d'une pression modérée.

- Fixation de la poche du produit à déleucocyter à une potence afin de faire écouler le PSL par gravité à travers le filtre.

- Purge de l'air présent dans la poche de recueil afin de limiter la perte de produit dans le dispositif.

L'étape de validation du procédé est importante et ne saurait être négligée.

En effet, chaque procédé est dépendant de l'environnement de production dans lequel il s'intègre (circuits, locaux, matériel, procédures) ce qui le rend presque spécifique à un centre de transfusion.

Pour garantir la reproductibilité des résultats et l'efficacité de la déleucocytation, il est important de suivre les recommandations du fournisseur (température, hauteur de gravité et âge du produit).

Ces recommandations seront appliquées dans le respect des bonnes pratiques transfusionnelles.

Quand doit-on réaliser la déleucocytation ?

La période la plus propice pour la filtration doit se situer au moment où les macrophages ont terminé leur travail de phagocytose et avant que les leucocytes ne libèrent les facteurs d'activation tels que les cytokines et l'histamine. De même après un certain temps, la lyse leucocytaire génère des débris cellulaires, des facteurs d'activation, et potentiellement la libération des virus intra leucocytaires et des bactéries encore viables.

Les bonnes pratiques transfusionnelles définissent un délai maximum de 48 heures pour les concentrés plaquettaires et de 8 jours pour les concentrés érythrocytaires.

La plupart des centres de transfusion ont adopté la pério-

de optimale entre 24 h et 48 h après le prélèvement.

Contrôle des résultats

La méthode la plus couramment utilisée est la numération à la cellule de Nageotte.

Cette technique consiste à compter, sous microscope, le nombre de leucocytes présents dans les 50 micro-litres du compartiment de la cellule.

L'utilisation du liquide de Hayem permet de lyser les globules rouges et de colorer les noyaux des leucocytes. Le décompte est facilité par la présence d'un quadrillage gravé sur le fond de la cellule.

La cytométrie en flux permet la lecture et l'identification des éléments figurés de l'échantillon. Cependant, cette technique nécessite encore une standardisation plus systématique.

Contrôler 100% de la production poserait des problèmes notamment dans les pays où la déleucocytation est systématique.

La technique de l'échantillonnage est mieux adaptée à ces contrôles et permet d'atteindre un degré de confiance supérieur à 95% quant à la qualité du produit.

La déleucocytation en occident et en Tunisie

En Occident, notamment en France, les tentatives de déleucocytation des concentrés érythrocytaires datent de plus de 30 ans.

Dès 1962, Green Watt proposait une méthode par filtration sur des filtres en Nylon disposés en colonne. Les méthodes de filtration à travers des fibres d'acétate de cellulose, puis l'apparition de boîtiers filtrants dans les années 1980 marquent le début d'une période d'amélioration notable des performances et de la facilité d'utilisation des filtres à déleucocyter. (3)

Au début des années 1990, l'apparition de la connexion stérile a rendu possible la déleucocytation sans risque septique. Cette technique permettra de généraliser la déleucocytation précoce et de conserver plus longtemps les produits ainsi préparés. Enfin l'intégration directe par les fabricants d'un filtre dans le dispositif de prélèvement a permis de s'affranchir de l'étape de la connexion.

En France et depuis Avril 1998, la déleucocytation est rendue obligatoire pour l'ensemble des concentrés érythrocytaires et plaquettaires homologues. Cette mesure est actuellement étendue aux plasmas de fractionnement et de sécurisation. (1)

En Tunisie la déleucocytation a timidement démarré au début des années 1990. Elle concernait quelques unités de concentrés globulaires et se faisait au Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) et au Centre Militaire de Transfusion Sanguine (CMTS). Les bénéficiaires étaient des malades ayant présenté d'importantes réactions de frissons hyperthermie parmi les polytransfusés et les candidats à la greffe de moelle osseuse.

Progressivement le nombre de demandes de PSL déleucocytés a augmenté, provenant surtout des services d'hématologie, de l'unité de greffe de moelle osseuse, des services et centres d'hémodialyse, des services de pédiatrie et de médecine interne.

Les indications principales étaient la prévention des réactions de frisson-hyperthermie et l'allo-immunisation Anti HLA.

Ainsi, de quelques dizaines d'unités déleucocytées en 1990 on est passé en 2001 à :

* 7000 CGR déleucocytés dont

- 5600 au CNTS
- 510 au Centre Régional de Transfusion Sanguine (CRTS) de Sfax
- 320 au CRTS de Sousse
- 570 au CMTS

* 920 concentrés plaquettaires déleucocytés :

- 912 au CNTS
- 8 au CRTS de Sfax

Ainsi la déleucocytation concerne près de 7% de la production nationale en concentré globulaire et moins de 5% des concentrés standard de plaquettes alors que plus de 80% des concentrés unitaires de plaquettes sont filtrés.

Cette déleucocytation se fait actuellement par des filtres connectables.

La disponibilité sur le marché international de dispositifs de prélèvement avec filtre en série, facilite la procédure et la rend accessible à tous les centres régionaux et les banques de sang.

Reste le problème du coût d'une telle généralisation. Le dispositif de prélèvement avec filtre en série coûte trois fois plus qu'une poche de sang triple classique.

L'unité centrale de transfusion sanguine et des banques du sang en association avec les principaux acteurs de la transfusion sont en train d'étudier l'opportunité de généraliser une telle pratique dans un proche avenir.

Conclusion

La déleucocytation contribue à améliorer la qualité et la sécurité des produits sanguins labiles.

Elle vise à améliorer la qualité des PSL en réduisant au maximum le nombre de leucocytes par unité sanguine transfusable. Ainsi filtrés, les PSL seront dénués ou du moins fortement atténués en matière de risque de :

- Réaction de frisson-hyperthermie.
- Alloimmunisation anti HLA.
- Transmission de maladies virales à développement intra leucocytaire.
- Risque bactérien par lyse des macrophages renfermant des bactéries.
- Transmission hypothétique des prions.

Si sa généralisation est un fait établi dans la plupart des pays occidentaux, la progression de sa prescription est en nette progression en Tunisie, notamment dans la capitale. Sa généralisation à tous les PSL grâce aux dispositifs de prélèvement en série ne saurait tarder.

Références

1- Andreu G, Lemonnier MP. Déleucocytation des produits sanguins labiles et prévention de la transmission de virus par transfusion sanguine. In : Ghnassia JC, Harzic M, Maisonneuve P, Noel

L. XIe Colloque de virologie de Versailles-Le Chesnay. Paris : Elsevier 1997. p.131-9.

2- Dzik W. Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. *Immunol Invest* 1995 ; 24 : 95-115

3- Dumont LJ, Dzik WH, Rebullia P, Brandwein H, and the members of the BEST-ISBT working party. Practical guidelines for process validation and process control of white cell-reduced blood components. Report of the Biomedical excellence for safer transfusion (BEST) working party of the international Society of blood transfusion (ISBT). *Transfusion* 1996 ; 36 : 11-20

4- Gilbert GI, Hayes K, Hudson H, James J. Prévention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection. *Lancet* 1989 ; 334 : 1228.

5- JA loos, JL Wautier. Leukocyte depletion : a biotechnical transfusion story. *Transfus Clin Biol* 1998 ; 5 : 64-79

6- Manuel des bonnes pratiques transfusionnelles UCTSBS/ Ministère de la santé publique

7- Masse M, Naegelen C, Pelligrini N, Segier JM, Marpoux N, Beau-jean F. Validation of a single method to count very low white cell concentrations in filtered red blood cells or platelets. *Transfusion* 1992, 32 : 565-71

8- Strauss RG. Leukocyte-reduction to prevent transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *pediatric Transplant* 1999 ; 3 Suppl I : 19-22

9- Seghatchian MJ. an overview of laboratory and clinical aspects of leukocyte-depleted blood components. *Transfus sci* 1994 ; 15 : 49-62

10- Stenecker I et al. Leukocyte filtration mechanisms. Factors influencing the removal of infectious agents from red cell concentrates. *Immunol Invest* 1995 ; 24 : 87-93.