



**HAL**  
open science

# Hirudothérapie et risques infectieux au CHU Amiens-Picardie : proposition de mise en place de protocoles de surveillance bactériologique de l'eau de conservation et de décontamination des sangsues

Quentin Floug

► **To cite this version:**

Quentin Floug. Hirudothérapie et risques infectieux au CHU Amiens-Picardie : proposition de mise en place de protocoles de surveillance bactériologique de l'eau de conservation et de décontamination des sangsues. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03229996

**HAL Id: dumas-03229996**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03229996v1>**

Submitted on 19 May 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 01 octobre 2020**

par

**Monsieur Quentin FLOUG**

**Hirudothérapie et risque infectieux, au CHU d'Amiens-  
Picardie**

**Proposition de mise en place de protocoles de surveillance  
bactériologique de l'eau de conservation et de  
décontamination des sangsues**

**Membres du jury :**

**Président du jury : Pr. Gilles DUVERLIE**

**Directeur de thèse : Dr. Farida HAMDAD**

**Assesseurs : Pr. Nadine LEMAÎTRE**

**Dr. Hélène VACHER**

**Thèse n°**





**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 01 octobre 2020**

par

**Monsieur Quentin FLOUG**

**Hirudothérapie et risque infectieux, au CHU d'Amiens-  
Picardie**

**Proposition de mise en place de protocoles de surveillance  
bactériologique de l'eau de conservation et de  
décontamination des sangsues**

**Membres du jury :**

**Président du jury : Pr. Gilles DUVERLIE**

**Directeur de thèse : Dr. Farida HAMDAD**

**Assesseurs : Pr. Nadine LEMAÎTRE**

**Dr. Hélène VACHER**

**Thèse n°**

## REMERCIEMENTS

### A mon président de jury :

**Monsieur le Professeur Gilles DUVERLIE**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon plus grand respect.

### A mes juges :

**Madame le Professeur Nadine LEMAÎTRE**

Je vous remercie pour votre présence et de l'attention que vous portez à mon travail. Recevez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

**Madame le Docteur Hélène VACHER**

Vous avez accepté avec bienveillance d'évaluer cette thèse. Merci pour votre aide au cours de ce travail. Soyez assurée de ma reconnaissance et de toute ma considération.

### A ma directrice de thèse :

**Madame le Docteur Farida HAMDAD**

Il fallait oser se lancer dans cette aventure avec moi il y a déjà 3 ans! Un grand merci pour tes conseils, ta bienveillance, ta patience, ta disponibilité à toute épreuve et ton accompagnement tout au long de ce travail. Je te suis très reconnaissant. Merci pour tout.

### A Adrien et Kaies :

Un grand merci à tous les deux pour votre aide précieuse. Tout cela n'aurait pu être possible sans vous.

### A mes co-internes (Sophie, Amandine, Laurine, Cécile, Stacy, Mehdi, Mathilde et les autres) :

Pour tous les bons moments passés durant ces 4 années d'internat.

**Aux techniciens du laboratoire de bactériologie du CHU d'Amiens-Picardie :**

Merci pour votre disponibilité et le partage de vos connaissances tout au long de cette thèse.

**A mes ami(e)s de la fac et du lycée :**

Pour votre présence et tous les moments partagés depuis longtemps.

Je dédie également cette thèse :

**A mes parents, mes grands-parents et à mon frère :**

Pour avoir été présents depuis toujours, pour m'avoir constamment soutenu et encouragé pendant toutes ces longues années. Il n'y a pas de mots pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissant!

**A ma belle-famille :**

Pour votre soutien et vos encouragements depuis quelques années.

**A Léa :**

Pour ton amour et tout ce que tu m'apportes au quotidien. Merci de me rendre heureux. De belles choses nous attendent encore.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	7
GENERALITES.....	10
<b>A. <i>Hirudo medicinalis</i> : la sangsue médicinale.....</b>	<b>11</b>
I. Présentation de la sangsue médicinale.....	11
II. De la production à l'utilisation.....	17
III. Indications et propriétés.....	22
IV. Microbiote des sangsues et symbiose.....	26
<b>B. <i>Aeromonas</i>.....</b>	<b>28</b>
I. Habitat.....	28
II. Pouvoir pathogène.....	29
III. Physiopathologie.....	30
IV. Facteurs de virulence.....	31
V. Caractères bactériologiques.....	34
VI. Sensibilité aux antibiotiques.....	35
VII. Activité des antiseptiques.....	37
TRAVAIL PERSONNEL.....	39
<b>A. Cas clinique.....</b>	<b>40</b>
<b>B. Etude rétrospective de l'utilisation de l'hirudothérapie au CHU d'Amiens- Picardie sur une période de 9 ans.....</b>	<b>46</b>
<b>C. Proposition d'un protocole d'analyse bactériologique de l'eau de conservation ..</b>	<b>51</b>
<b>D. Proposition d'un protocole de décontamination des sangsues avant dispensation dans les services cliniques.....</b>	<b>58</b>
DISCUSSION.....	64
CONCLUSION.....	70
PERSPECTIVES.....	72
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74
ANNEXES.....	87

# LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : a- Sangsue au repos, b- Sangsue active .....	11
<u>Figure 2</u> : Ventouses d'une sangsue .....	12
<u>Figure 3</u> : a- Bouche d'une sangsue, b- Incision caractéristique de la morsure .....	12
<u>Figure 4</u> : Coupe longitudinale de sangsue .....	14
<u>Figure 5</u> : a- Cocon, b- Sangsue sortie d'un cocon .....	15
<u>Figure 6</u> : Bocal de stockage des sangsues.....	19
<u>Figure 7</u> : « Kit sangsue ».....	20
<u>Figure 8</u> : Méthodes d'application d'une sangsue.....	21
<u>Figure 9</u> : Etapes de l'hémostase.....	23
<u>Figure 10</u> : Utilisation des sangsues dans les cas a- d'un hématome, b- d'arthrose cervicale .	24
<u>Figure 11</u> : Symbiose dans le tube digestif de la sangsue .....	27
<u>Figure 12</u> : Sources environnementales des <i>Aeromonas</i> .....	29
<u>Figure 13</u> : Facteurs de virulence des <i>Aeromonas</i> .....	32
<u>Figure 14</u> : Aspects des colonies d' <i>A. hydrophila</i> sur a- GS et b- CPS .....	34
<u>Figure 15</u> : Antibiogramme d' <i>A. hydrophila</i> BLSE.....	41
<u>Figure 16</u> : Ensemencement par filtration de l'eau de conservation .....	42
<u>Figure 17</u> : Culture en nappe de l'eau de conservation .....	42
<u>Figure 18</u> : Espèces isolées des eaux de conservation et leur fréquence d'apparition .....	43
<u>Figure 19</u> : Lots de sangsues .....	51
<u>Figure 20</u> : Ensemencement de l'eau de conservation .....	52
<u>Figure 21</u> : Résultat de culture de l'eau de conservation sur CPS .....	54
<u>Figure 22</u> : Evolution du nombre de bactéries isolées en fonction de la périodicité du renouvellement de l'eau .....	56
<u>Figure 23</u> : Culture d'une sangsue sur CPS.....	58
<u>Figure 24</u> : Protocole de décontamination externe des sangsues .....	60
<u>Figure 25</u> : Cultures après décontamination avec de l'eau physiologique.....	62
<u>Figure 26</u> : Cultures après décontamination avec de la chlorhexidine.....	63
<u>Figure 27</u> : Cultures après décontamination avec du Dakin®.....	63



# LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Activité des différentes molécules sécrétées par les sangsues .....	25
<u>Tableau II</u> : Diversité des infections liées aux <i>Aeromonas</i> .....	30
<u>Tableau III</u> : Mécanismes de résistance des principales espèces d' <i>Aeromonas</i> .....	37
<u>Tableau IV</u> : Ecologie bactérienne des eaux de conservation de 4 lots de sangsues .....	43
<u>Tableau V</u> : Phénotypes de résistance des espèces isolées .....	44
<u>Tableau VI</u> : Analyse de la prescription des sangsues médicinales au CHU Amiens-Picardie entre 2010 et 2018 .....	47
<u>Tableau VII</u> : Caractéristiques de la cohorte étudiée .....	49
<u>Tableau VIII</u> : Résultats bactériologiques des eaux de conservation des sangsues .....	53
<u>Tableau IX</u> : Numération des colonies .....	55
<u>Tableau X</u> : Moyennes du nombre de colonies d' <i>A. veronii bv sobria</i> et de <i>C. gilanii</i> avant et après le renouvellement de l'eau .....	56
<u>Tableau XI</u> : Phénotypes de résistance des espèces isolées dans l'eau de conservation .....	57
<u>Tableau XII</u> : Résultats bactériologiques de la flore mésophile des sangsues .....	61
<u>Tableau XIII</u> : Phénotypes de résistance des espèces isolées dans la flore des sangsues .....	62

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Abréviations</b>	<b>Définitions</b>
<b>AMM</b>	Autorisation de Mise sur le Marché
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
<b>ARN16S</b>	Acide ribonucléique ribosomique de sous-unité 16S
<b>BLSE</b>	$\beta$ -Lactamase à Spectre Etendu
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>CHU</b>	Centre Hospitalo-Universitaire
<b>CMF</b>	Chirurgie maxillo-faciale
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CPS</b>	Chromogenic Peptide Substrate
<b>C3G</b>	Céphalosporines de troisième génération
<b>EUCAST</b>	European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GS</b>	Géloses au sang
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>MBL</b>	Métallo $\beta$ -lactamase
<b>MCK</b>	Géloses Mac conkey
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PVP</b>	Povidone
<b>Résapath</b>	Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales
<b>TIAC</b>	Toxi-infection alimentaire collective
<b>TLR4</b>	Toll Like Receptor 4
<b>TTC</b>	Toutes Taxes Comprises
<b>T2SS</b>	Système de Sécrétion de Type 2
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UK</b>	United-Kingdom
<b>USA</b>	United States of America

# **INTRODUCTION**

L'histoire entre l'homme et la sangsue est faite de peur, de dégoût mais aussi de curiosité. La sangsue a fait son apparition à l'époque de l'Égypte Antique et son utilisation a persisté au cours des âges. La popularité de l'annélide a varié à travers les siècles en fonction des convictions de la hiérarchie médicale (1).

Pour des raisons inexplicables, la sangsue est devenue très à la mode au XIX<sup>ème</sup> siècle. C'est la France qui en était alors le plus gros consommateur, notamment sous l'impulsion de Broussais, chirurgien des armées napoléoniennes. Les médecins abusaient de son utilisation pour traiter tout et n'importe quoi. De véritables fermes d'élevage virent ainsi le jour, notamment dans les milieux marécageux du sud de la France où les sangsues étaient déjà présentes à l'état sauvage : elles se nourrissaient lors du passage des animaux (bétail, chevaux) et s'y reproduisaient naturellement. Puis leur utilisation déclina avant de tomber en désuétude au début du XX<sup>ème</sup> siècle avec les progrès de la médecine conventionnelle (2).

Depuis les années 80 et 90, les propriétés de l'hirudothérapie ont été mises en évidence et son utilisation est réapparue, parallèlement au développement des lambeaux libres et pédiculés en chirurgie plastique et des réimplantations de phalanges, avec cette fois comme indication principale la congestion veineuse des lambeaux (3).

Les bienfaits de la sangsue n'ont été reconnus que très récemment et en 2004, la Food and Drug Administration (FDA) a donné son agrément à l'hirudothérapie comme dispositif médical (3).

Les indications se sont multipliées et l'utilisation des sangsues a été de plus en plus importante. Pourtant, le fonctionnement et les risques liés à l'utilisation de ces animaux restent relativement méconnus par les services prescripteurs.

Les sangsues sont des animaux hématophages et hermaphrodites qui vivent en symbiose obligatoire avec une bactérie : *Aeromonas*. Cette bactérie est présente dans le tube digestif des sangsues et est indispensable à la digestion du sang.

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif, habituellement reconnus comme étant responsables, principalement, de diarrhées aqueuses chez l'Homme. Dans le cadre de l'hirudothérapie, la présence de ces bactéries peut faire craindre des infections cutanées lors de la morsure de l'annélide mais également, un risque d'échec de la reconstruction par lambeaux ou de la réimplantation d'un membre, dans 70% des cas (4).

L'infection liée à l'utilisation des sangsues n'est pas le seul inconvénient. A l'heure où la résistance des bactéries aux antibiotiques ne cesse d'augmenter, les *Aeromonas* ne font pas figure d'exception et de nombreux cas de résistance ne cessent d'apparaître.

Actuellement, les infections liées à l'hirudothérapie et la résistance aux antibiotiques des *Aeromonas*, bactérie intégrante de la flore des sangsues, sont de plus en plus rapportées.

L'objectif de ce travail de thèse est de faire un état des lieux de l'utilisation des sangsues médicinales et d'améliorer les pratiques au Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) d'Amiens-Picardie afin de réduire le risque infectieux et l'apparition d'une résistance des bactéries vivant en étroite symbiose avec ce petit animal.

Nous proposons pour cela dans un premier temps, une revue bibliographique actualisée sur la sangsue médicinale et sur l'*Aeromonas*.

Dans un deuxième temps, nous décrivons un cas clinique à partir duquel ce travail a commencé et une étude rétrospective réalisée au CHU d'Amiens-Picardie, sur une période de 9 ans.

Dans un troisième temps, les bonnes pratiques de l'utilisation des sangsues (surveillance bactériologique de l'eau de conservation et décontamination externe) seront proposées, avec pour objectif la réduction du risque infectieux.

# **GENERALITES**

## **A. *Hirudo medicinalis* : la sangsue médicinale**

### **I. Présentation de la sangsue médicinale**

#### 1. Classification

Il existe plus de 700 espèces de sangsues. *Hirudo medicinalis* est l'espèce la plus utilisée en médecine (3). Elle appartient à l'embranchement des Annélides, la classe des Achètes, l'ordre des Gnathobdellés, la famille des *Hirudineae*, genre *Hirudo*.

#### 2. Morphologie

La sangsue est un ver annelé, aplati dorso-ventralement, composée d'une trentaine de segments. La taille est variable selon l'espèce, la température et l'activité de la sangsue. A une température de +4°C, la sangsue est inactive et mesure environ 3 cm de long pour 1 cm de large. Lorsqu'elle est rétractée, elle a la forme d'une olive (Fig. 1a) et pèse 1 à 2 grammes (3). A température ambiante ou lors d'un repas sanguin, la sangsue prend l'aspect d'un long ruban plat et peut atteindre 12 cm de long pour 3 cm de large (Fig. 1b). Son poids peut alors atteindre 15 grammes (5).

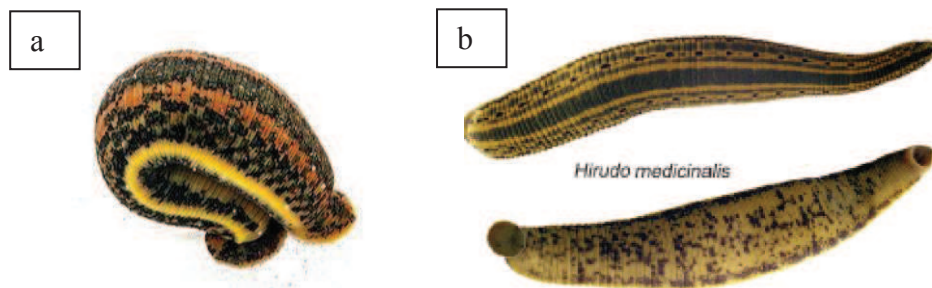


Figure 1 : a- Sangsue au repos, b- Sangsue active (1)

Les sangsues sont des invertébrés et ne possèdent pas d'endosquelette osseux, mais sont composées, principalement, de muscles (5).

Elles sont recouvertes d'une enveloppe musculo-dermique avec un renouvellement régulier de l'épiderme (mue) où se trouvent des glandes unicellulaires qui jouent un rôle dans la lubrification. La respiration s'effectue grâce à l'épiderme (voie transcutanée). La présence d'extrémités nerveuses, au niveau de la couche externe de l'épiderme, permet aux sangsues de déceler la présence de vibrations (6).

La tête est à l'extrémité effilée, la plus étroite (3). Deux ventouses sont retrouvées, une à chaque extrémité du corps (Fig. 2). La ventouse antérieure ou buccale est perforée par une bouche qui permet de réaliser la succion. La présence de chimiorécepteurs au niveau de la ventouse buccale permet aux sangsues de repérer les odeurs et les stimuli chimiques (3, 5). Les sangsues sont très sensibles aux odeurs fortes comme le parfum, la sueur ou le chlore qui les empêchent de se fixer sur leur proie (2, 5). La ventouse postérieure est plus grande, non perforée et indispensable au déplacement de la sangsue lorsqu'elle est sur un support (5, 7). Dans l'eau, elle se déplace grâce à des mouvements ondulatoires (5).

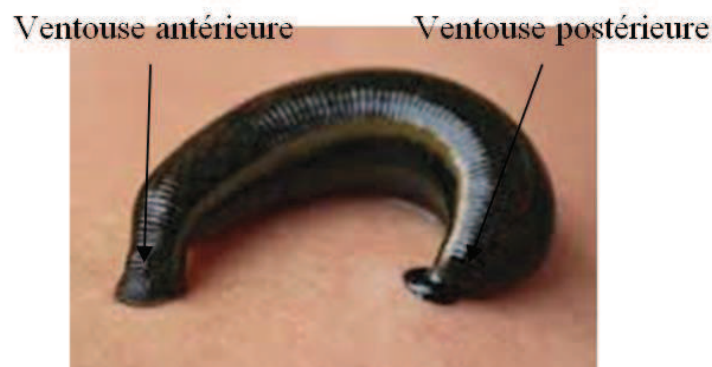


Figure 2 : Ventouses d'une sangsue

La bouche est munie de 3 mâchoires (Fig. 3a) composées de 60 à 100 paires de dents chacune, qui servent à inciser la peau de la proie en laissant une morsure caractéristique en forme de Y (Fig. 3b) (3).

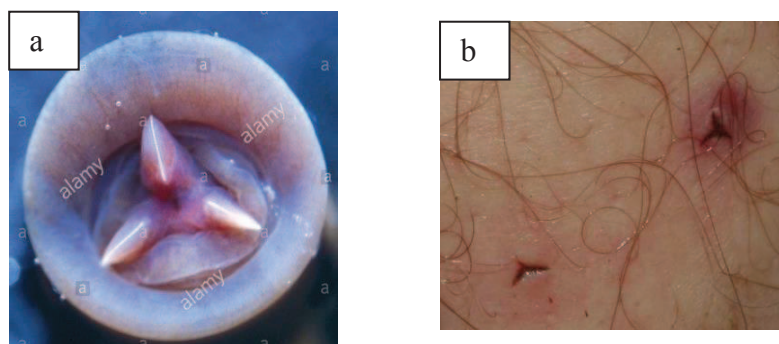


Figure 3 : a- Bouche d'une sangsue, b- Incision caractéristique de la morsure

Les yeux, au nombre de 5 paires, sont disposés à la face supérieure de la ventouse buccale. Chacun des dix yeux possède environ 50 photorécepteurs, et chaque œil a un champ



visuel distinct. Grâce à ce système, les sangsues ont une vision sommaire des formes et détectent les parties du corps qui sont à la lumière et à l'obscurité. A la surface des yeux, existent des cils, permettant à la sangsue de déceler tout mouvement (8, 9).

Les sangsues ne sont pas dotées d'organe auditif.

Le système nerveux est composé d'une chaîne nerveuse ventrale et d'un collier médullaire. La chaîne nerveuse, avec 21 ganglions cérébroïdes antérieurs, s'étend de la bouche à la ventouse postérieure. Le collier médullaire entoure le début de l'œsophage (6).

L'appareil digestif est divisé en 4 parties (Fig. 4) :

- Le pharynx, composé de nombreuses glandes salivaires, permet la succion et la déglutition du sang (5).
- Un œsophage court qui permet au repas de passer dans l'estomac, grâce au péristaltisme pharyngien (6).
- L'estomac est le plus grand compartiment du tube digestif, il est extensible et a la forme d'un tube muni de 11 cæcums gastriques (6). Ces cæcums permettent le stockage du repas sanguin en quantité importante pendant plusieurs mois. La digestion du repas sanguin des sangsues est extrêmement lente. L'eau et les sels issus du sang ingéré sont éliminés au niveau des néphridies, laissant ainsi un liquide intra-luminal visqueux, composé essentiellement d'érythrocytes et d'hémocytes (10).
- L'intestin moyen constitue la zone active de la digestion. L'intestin postérieur ou rectum se termine par l'anus (11).

L'appareil circulatoire comprend 4 vaisseaux sanguins : un ventral, un dorsal et deux vaisseaux latéraux contractiles réunis par des réseaux de fins capillaires (5, 7). Les sangsues ne sont pas dotées de cœur (7).

L'appareil urinaire est composé de 17 paires de néphridies. Chaque néphridie est prolongée par un canal excréteur et débouche sur la vessie (5).

Les sangsues sont des animaux hermaphrodites mais n'ont pas la capacité de s'auto-fertiliser. La reproduction est de type sexué, et les deux appareils génitaux sont indépendants (3, 5).

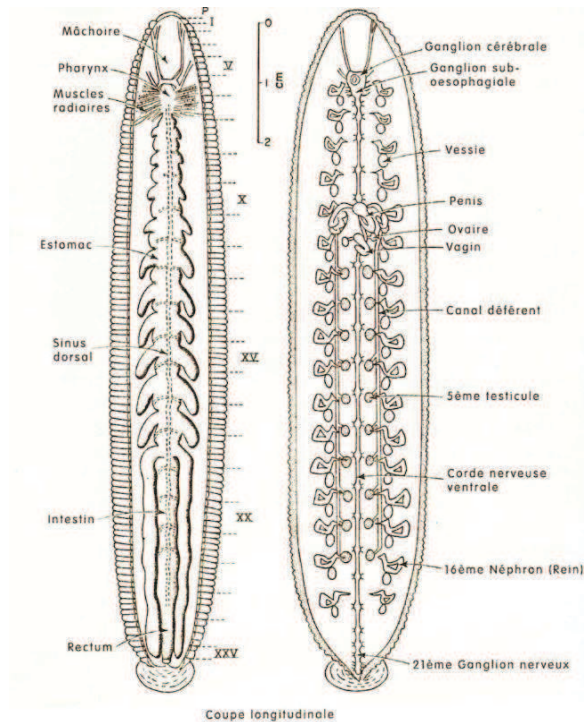


Figure 4 : Coupe longitudinale de sangsue

### 3. Habitat

#### a. Milieu de vie naturel

Les sangsues médicinales sont des parasites dulçaquicoles, vivant et se reproduisant, essentiellement, dans des eaux douces (étangs, mares, marais, cours d'eau) (5).

Elles sont amphibies et capables de vivre hors de l'eau, dans une atmosphère humide.

Les sangsues ont la possibilité de s'enterrer dans la vase ou dans la tourbe quand la température est trop froide ou trop chaude. Elles supportent mal les changements brutaux de température (5).

La température et l'acidité des eaux sont des facteurs qui peuvent limiter leur activité et leur reproduction. La température optimale est comprise entre 20 et 25°C et le pH optimal est neutre.

La reproduction a lieu dans l'eau au printemps ou en été. La ponte se produit un mois environ après la fécondation. Les sangsues quittent l'eau pour aller pondre dans la terre humide à proximité de la rive.

En dehors de cette période, les sangsues adultes peuvent peupler des eaux avec une température inférieure, mais leur activité est fortement diminuée.

Le rendement de la fécondité est faible puisqu'une sangsue adulte ne produit qu'un ou deux cocons par saison de reproduction. Le cocon est constitué d'une enveloppe spongieuse ou fibreuse, de 2 à 3 cm de long et de large, contenant une dizaine d'œufs (Fig. 5a) (5).

Au bout de 3 semaines, au minimum, les nouveau-nés perforent le cocon et vont rejoindre le milieu aquatique où ils poursuivent leur développement. Les sangsues nouvellement nées sont transparentes, filiformes et mesurent quelques millimètres de long (Fig. 5b). Elles atteignent leur taille définitive et leur maturité sexuelle vers 5 à 6 ans dans la nature (contre 2 ans au laboratoire si elles sont bien nourries). La longévité de l'espèce dépasse 15 ans (5).

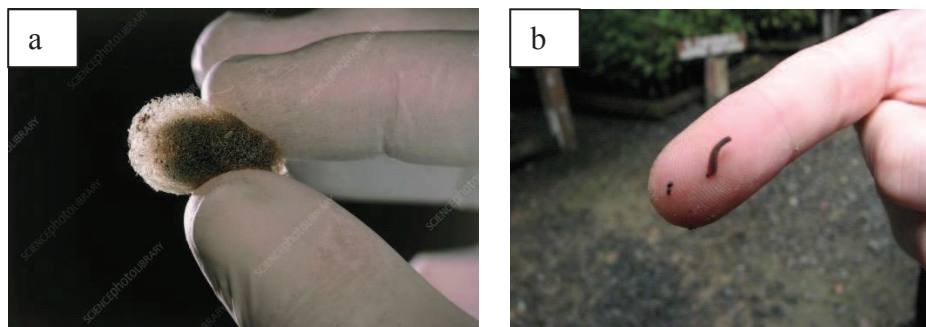


Figure 5 : a- Cocon, b- Sangsue sortie d'un cocon

L'assèchement des marais dû au réchauffement climatique, les pesticides et la pollution sont responsables de la disparition des sangsues dans la nature (12).

#### b. Elevage

En France, le seul centre d'hirudiculture est situé à Audence, dans le bassin d'Arcachon. La société d'exploitation, Ricarimpex®, a été fondée en 1845.

Ricarimpex® subvient non seulement aux besoins de la France, mais exporte en Allemagne et aux Etats-Unis d'Amérique (USA) 60% de sa production.

La culture des sangsues chez Ricarimpex® est réalisée à la fois en plein air, mais, également en laboratoire (7).

### Elevage en bassin

C'est la méthode d'élevage traditionnelle. Les sangsues se trouvent dans des bassins dont la qualité de l'eau est contrôlée par des biologistes de la société, et se nourrissent de la faune locale.

Les sangsues ont besoin de conditions adaptées : une végétation aquatique dense, un milieu aquatique avec un pH proche de la neutralité, une température comprise entre 20 et 25°C, une eau dépourvue d'engrais chimiques et de bonne qualité bactériologique (7).

Des îlots de terre plantés d'herbes aquatiques ainsi que des plages de tourbe en bordure de bassin, ont été aménagés afin que les sangsues puissent pondre. De tels bassins peuvent accueillir plusieurs milliers d'individus mais les pertes sont grandes, puisque seulement 10% atteignent l'âge adulte.

L'inconvénient de ces bassins est qu'ils sont soumis aux variations climatiques (température et luminosité). Les sangsues sont récoltées à l'aide d'épuisettes puis triées au laboratoire (7). Les sangsues trop petites sont nourries au laboratoire jusqu'à ce qu'elles atteignent un poids commercialisable (> 1 gramme).

### Elevage en laboratoire

Actuellement, l'élevage en laboratoire est le mode d'élevage privilégié. Les sangsues y sont élevées en bocaux, dans l'obscurité, et séparées par classe d'âge et de stade physiologique, ce qui permet une meilleure traçabilité.

L'eau employée pour le maintien des sangsues ne doit être ni trop calcaire, ni trop chlorée ; l'eau du robinet ne convient pas.

L'eau la plus utilisée est une eau supplémentée en permanganate de potassium (à une faible dose), qui permet d'éliminer les algues, les cyanobactéries, les champignons et les vers qui se forment sur les parois des bocaux (13).

#### 4. Alimentation

La sangsue médicinale est une espèce hématophage. Dans le milieu naturel, elle se nourrit préférentiellement du sang des mammifères. Les jeunes sangsues s'alimentent de larves d'insectes, de petits poissons, de Gastéropodes ou encore d'Amphibiens (5). Adultes, ces sangsues peuvent parasiter les chevaux, les bœufs ou les grenouilles. Elles sucent le sang pendant une trentaine de minutes puis tombent d'elles-mêmes. Une fois rassasiée, la sangsue ne mord plus (14).

La proie potentielle est identifiée par son mouvement et la production de stimuli thermiques. Une combinaison de ces facteurs stimule le comportement d'alimentation. La sangsue mord à une température correspondant à celle du corps humain (15).

Chez l'exploitant Ricarimpex®, le sang de volaille est le repas sanguin principal des sangsues. Il est préféré au sang de mammifères car le risque de transmission des infections à l'homme est plus faible. Le sang de volaille est issu d'un abattoir certifié. Un contrôle vétérinaire des volailles abattues est réalisé avec une analyse microbiologique du sang (7, 13).

Les sangsues sont nourries tous les mois jusqu'à obtention de la taille idéale pour l'utilisation médicale (7, 13).

Au moment de la vente aux hôpitaux, les sangsues ont été, au préalable, à jeun depuis au moins 3 mois. Les sangsues sont très résistantes au jeûne. Certaines peuvent tenir jusqu'à 18 mois sans manger (3).

## **II. De la production à l'utilisation**

### 1. Statut réglementaire des sangsues

En France, la sangsue a pendant longtemps eu un statut qui n'était pas clairement défini. Cependant, depuis 2013, la sangsue médicale posséderait le statut de médicament selon l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM).

En revanche, ce médicament ne dispose pas encore d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

En Allemagne, où l'hirudothérapie est beaucoup plus développée qu'en France, les espèces *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* et *Hirudo orientalis* possèdent le statut de médicament depuis 2008 et sont soumises à l'AMM (16).

Depuis 2004, aux USA, la FDA a officiellement attribué aux sangsues médicinales commercialisées par Ricarimpex®, le statut de dispositif médical (17).

Au Royaume-Uni (UK), Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA) a également, conféré le statut de médicament aux sangsues (18).

## 2. Commande et transport

La pharmacie de l'hôpital envoie un fax à Ricarimpex® pour effectuer sa commande de sangsues. Le fournisseur prépare puis expédie les sangsues dans un sac en coton humidifié, placé dans une boîte de polystyrène étanche permettant leur transport en toute sécurité (7, 13). Des conditions optimales de fraîcheur (entre 2 et 8°C) sont respectées au maximum. La livraison est effectuée dans les 24 heures par un transporteur express. Pour l'Europe, les délais de livraison sont de 1 à 2 jours (7, 13).

Lors de la première commande, une notice de conservation est jointe précisant les modalités d'entretien et de destruction après usage des animaux [Annexe 1].

Le prix d'achat unitaire moyen d'une sangsue est de 9,02 euros TTC (Toutes Taxes Comprises). Le prix du transport est de 36 euros TTC.

## 3. Réception et conservation

Les sangsues sont réceptionnées par la pharmacie de l'hôpital. Lors de la réception, le pharmacien vérifie que les sangsues sont bien vivantes.

Les sangsues réceptionnées sont rincées à l'eau puis déposées dans des bocaux en verre, auxquels un numéro de lot est attribué. Ces récipients sont nettoyés à chaque nouvelle réception de lot. Les sangsues sont conservées dans ces bocaux (Fig. 6) dans les chambres froides de la pharmacie, à une température comprise entre  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  (19). C'est la température idéale de conservation. Plus la température est basse, plus la conservation sera longue. La température de l'enceinte est suivie par des logiciels de métrologie.

Les sangsues peuvent être conservées plusieurs mois (de 6 mois à 1 an), à l'abri de la lumière (19).

Le nombre de sangsues par bocal est limité afin qu'elles soient vigoureuses et bien portantes. Un nombre trop important de sangsues provoque du stress et est néfaste à leur activité. Dix sangsues au maximum peuvent être maintenues dans un bocal d'une contenance de 250 mL (19).

Il est important que les récipients utilisés soient ventilés. Ricarimpex® recommande [Annexe 1] de couvrir le contenant à l'aide d'un tissu en coton, fermement maintenu par des élastiques (Fig. 6). Un couvercle contenant des perforations peut être utilisé mais les perforations ne doivent pas être trop grandes afin d'éviter aux sangsues de s'échapper.



Figure 6 : Bocal de stockage des sangsues

L'eau de source (Cristaline®) ou l'eau minérale (Volvic®) en bouteille sont les eaux qui conviennent à la conservation des sangsues. Contrairement à l'eau du robinet, ces eaux ne contiennent ni additifs néfastes, ni chlore (20). L'eau distillée peut être utilisée, mais doit être supplémentée (19).

Aux USA et UK, une supplémentation de l'eau stérile ou distillée par Hirudosalt™ ou hirudoMix/gel est réalisée. Leeches United Kingdom commercialise une préparation saline : Hirudosalt™ (0,5 g/L d'eau) qui est à additionner à l'eau distillée, afin de constituer un milieu adéquat pour les sangsues (18). Cette préparation est composée de sels marins et de minéraux essentiels pour équilibrer les électrolytes dans l'eau stérile ou distillée (19).

L'eau de conservation des sangsues doit être renouvelée régulièrement. Si des sangsues sont retrouvées mortes, le fournisseur recommande de les retirer et de multiplier la fréquence de renouvellement de l'eau les jours suivants [Annexe 1]. Une fiche de traçabilité est recommandée.

#### 4. Dispensation aux services cliniques

Ce sont les services de chirurgie maxillo-faciale (CMF), chirurgie plastique, chirurgie orthopédique qui ont le plus souvent recours à l'hirudothérapie.

La prescription nominative est obligatoire et contient les mentions suivantes : nom du patient, date, nombre de sangsues requises et signature du clinicien.

Pour faciliter la dispensation, il existe un « kit sangsue » qui comprend une petite passoire, des pots à pommade en plastique, des étiquettes pré-imprimées, une bouteille d'eau (Cristaline® ou Volvic®) et une boîte de gants (Fig. 7).



Figure 7 : « Kit sangsue »

La manipulation est réalisée au niveau d'un point d'eau avec le bocal qui contient les sangsues et le kit de dispensation des sangsues. Le bocal est vidé dans la passoire jusqu'à obtention du nombre de sangsues nécessaires. Les sangsues obtenues sont rincées à l'eau minérale puis transférées dans un pot à pommade contenant un fond d'eau.

Les sangsues doivent être en « bon état » : pas de signes de blessures, pas de plaies, absence de traces de sang. La présence de toute anomalie conduit à la destruction de la sangsue selon les recommandations du fournisseur [Annexe 1].

Dans un délai de 15 à 20 minutes, le pot est remis au service prescripteur à température ambiante, température à laquelle les sangsues retrouvent leur vitalité.

La date, le nombre et le numéro de lot de sangsues sont tracés sur l'ordonnance par le pharmacien.

##### 5. Utilisation clinique

Le clinicien informe, au préalable, le patient de la nécessité d'avoir recours à l'hirudothérapie, ce qui est parfois difficile à accepter (21- 23).

La zone du corps concernée par l'indication est nettoyée à l'aide d'un savon neutre (savon doux haute fréquence, ANIOS®) et de l'eau et, éventuellement, rasée avant application et ce, afin d'améliorer l'accrochage de la sangsue. Cette zone est séchée vigoureusement afin que la friction provoque un réchauffement. La chaleur favorise la vasodilatation et constitue un puissant stimulant du comportement ingestif de la sangsue (20).

Les produits désinfectants possédant une odeur importante (le chlore par exemple) sont proscrits car ils peuvent avoir un effet répulsif (20, 22). Le patient ayant eu une anesthésie



récente ne peut bénéficier d'une hirudothérapie et doit attendre l'élimination complète du produit. Les produits anesthésiants diffusent au niveau de la peau, ce qui rend les sangsues moins actives (20).

L'utilisation de désinfectants à base d'alcool ou d'iode est déconseillée. L'alcool fait régurgiter la sangsue et augmente ainsi le risque infectieux (20). Les dérivés iodés sont toxiques et provoquent la mort de la sangsue.

Le port de gants et les pinces chirurgicales sont préconisés pour la manipulation des sangsues.

Plusieurs techniques d'application des sangsues sur la zone d'intérêt sont possibles; à l'aide d'une pince, d'une seringue ou d'un pot en verre (Fig. 8). Après quelques minutes, la sangsue se fixe.



Figure 8 : Méthodes d'application d'une sangsue

Les sangsues ayant été, préalablement, à jeun depuis quelques mois, auront tendance à mordre facilement. Néanmoins, en cas d'absence de morsure, une piqûre de la zone avec une aiguille peut être nécessaire. En cas d'absence de réaction d'une sangsue, une autre sera choisie.

Un apport pauvre en sang artériel au niveau des tissus à traiter ou un stress de l'animal peuvent expliquer la réticence à mordre.

Une fois fixée, la sangsue reste en place jusqu'à la fin de son repas (30 à 40 minutes). Lorsque la sangsue suce du sang, des ondes péristaltiques sont visibles et la taille augmente progressivement.

Un pansement très lâche au-dessus de la sangsue déjà fixée est possible et ce, afin d'éviter tout risque de fuite. La sangsue ne doit en aucun cas être retirée avant la fin de son repas sanguin, elle doit se décrocher d'elle-même. Les risques d'un retrait forcé sont les douleurs

pour le patient et une régurgitation des bactéries présentes dans le tube digestif des sangsues et par conséquent, un risque infectieux pour le patient.

Le saignement engendré par l'application des sangsues peut durer de 6 à 24h, le volume sanguin perdu est estimé entre 5 et 15 ml par sangsue (21). Durant cette phase, un bandage adapté au flux sanguin est nécessaire.

Le nombre de sangsues à appliquer dépend de l'indication, de la gravité et de la taille de la congestion. Une à cinq sangsues est/sont utilisée(s) pour chaque cure (22).

L'application est répétée à intervalle de temps régulier, en général, toutes les 2 à 8 heures (4).

La durée du traitement est fixée par le praticien, et varie en moyenne de 2 à 6 jours (21). Elle est basée sur une appréciation de la couleur de la peau, de la recharge capillaire et de la couleur des saignements (4).

Les différents sites de morsures sont surveillés quotidiennement jusqu'à cicatrisation. Le risque infectieux est présent (21-23).

## 6. Elimination

Les sangsues sont à usage unique et ne doivent en aucun cas être relâchées dans la nature ou réutilisées. Elles sont détruites dans leur pot d'origine, dans lequel de l'eau de Javel® est ajoutée. Les pots sont jetés dans les fûts spécifiques (Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux : DASRI) selon les recommandations du fournisseur [Annexe 1].

## **III. Indications et propriétés**

### 1. Rappel d'hémostase

Dans le cas classique d'une blessure (plaie, coupure), trois processus différents interviennent pour assurer le colmatage de la brèche vasculaire : l'agrégation plaquettaire, la coagulation et la fibrinolyse.

La première étape est l'hémostase primaire, qui se produit quelques minutes après la blessure et aboutit à l'agrégation des plaquettes (clou plaquettaire) au niveau de la brèche vasculaire. L'agrégat ainsi formé est néanmoins instable et perméable.

La seconde étape est le processus de coagulation qui permet, après une cascade d'activations enzymatiques, la solidification du clou plaquettaire par transformation du fibrinogène soluble en caillot de fibrine insoluble. La thrombine transforme le fibrinogène soluble en fibrine

insoluble et permet la consolidation de l'agrégat plaquettaire. Cette étape survient dans les minutes et heures après la lésion vasculaire (24).

L'étape de fibrinolyse a lieu dans les jours suivants. Elle permet la dissolution de la masse fibrino-plaquettaire qui a obturé la brèche (Fig. 9). Le caillot est dissout par la plasmine qui provient du plasminogène sanguin.

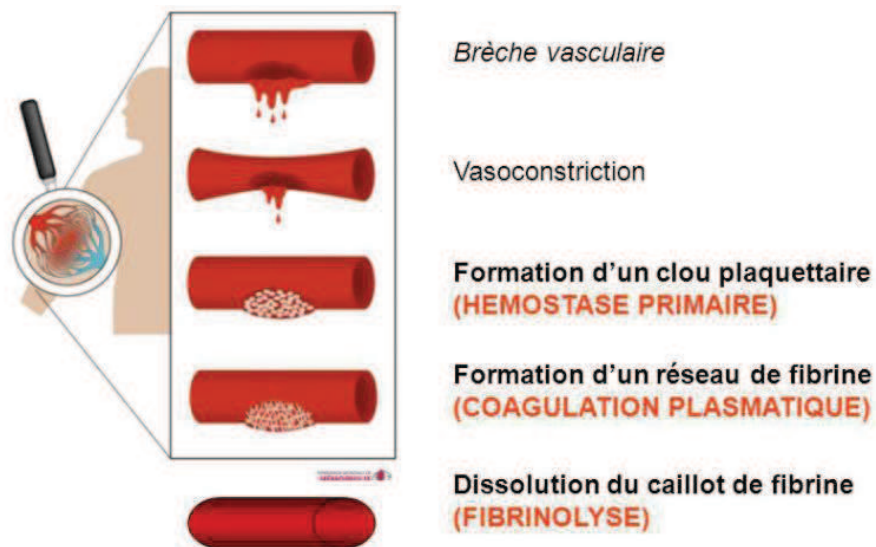


Figure 9 : Etapes de l'hémostase (25)

A l'état physiologique, la fluidité du sang tient à un équilibre entre les éléments qui tendent à faire coaguler le sang (facteurs de coagulation, plaquettes, ions calcium) et ceux qui tendent à empêcher la coagulation (inhibiteurs physiologiques).

## 2. Indications à l'hirudothérapie

La chirurgie réparatrice et la microchirurgie, principalement les lambeaux chirurgicaux (reconstruction mammaire), les réimplantations de membres (doigt, oreille, nez, lèvre) ou les transplantations tissulaires, liées à une congestion veineuse, sont les principales indications de l'hirudothérapie (4, 23). La congestion veineuse est le résultat d'un défaut de drainage du sang veineux qui conduit à l'accumulation de celui-ci dans le lambeau (26).

Les autres indications possibles sont les pathologies de la circulation veineuse (27), telles que les varices, phlébites, hématomes (Fig. 10a), œdèmes ou hémorroïdes ; les pathologies inflammatoires (arthrose (Fig. 10b), polyarthrite, tendinite) ; les maux de tête et migraines ;

les maladies cardiovasculaires (Infarctus du Myocarde, Accident Vasculaire Cérébral, angor) ; les pathologies oculaires avec mauvaise irrigation vasculaire comme la rétinopathie ou la thrombose oculaire (22, 28, 29).

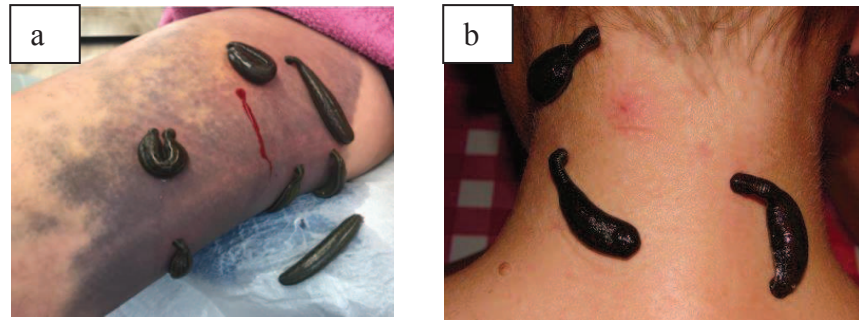


Figure 10 : Utilisation des sangsues dans les cas a- d'un hématome, b- d'arthrose cervicale

### 3. Propriétés et substances actives

La sangsue sécrète dans la salive plus d'une centaine de principes actifs tels que des anticoagulants, des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, des inhibiteurs de protéase, des vasodilatateurs et des anti-inflammatoires (Tableau I). Toutes ces substances font que le repas sanguin est réalisé dans de bonnes conditions pour la sangsue (22, 30). Seules les principales substances sécrétées seront citées dans ce travail de thèse.

Les anticoagulants et antiagrégants plaquettaires permettent à la sangsue de garder le sang sous forme liquide (22, 30, 31). L'hirudine (sécrétée par les glandes salivaires de la sangsue) est l'anticoagulant le plus efficace. Il s'agit d'un peptide injecté pendant la succion qui va agir de manière immédiate. Il va inhiber la thrombine afin de prévenir l'étape de coagulation du sang (22). Cet anticoagulant caractéristique de la morsure de la sangsue a une durée d'action d'environ 15 à 20 minutes.

Les inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire prennent le relais notamment grâce à certaines molécules (caline, apyrase, saratine et prostaglandines), qui agissent sur l'hémostase primaire et qui sont responsables du saignement prolongé jusqu'à plusieurs heures (30, 31).

Les substances vasodilatatrices ou histamine-like (acétylcholine et histamine), permettent à la sangsue d'avoir un flux sanguin suffisant lors de la succion (30).

Les facteurs de diffusion (hyaluronidases) dégradent l'acide hyaluronique augmentant ainsi la perméabilité des tissus et la diffusion de tous les principes actifs inoculés par la morsure d'Annélide à travers le tissu conjonctif (30, 31).

Les collagénases ont la même action, en clivant le collagène de la matrice extracellulaire (24, 31).

Dans la nature, les anti-inflammatoires (prostaglandines, églines et bdellines) permettent à la sangsue d'agir sans se faire repérer par l'hôte. Ces substances permettent de réduire la réaction immunitaire de l'hôte durant le repas sanguin et par conséquent l'inflammation (30, 31).

Les antalgiques (hirustatine), rendent la morsure peu douloureuse (31).

Les protéases antibactériennes (destabilase), bloquent la croissance bactérienne par destruction de la paroi des bactéries (31).

<b>Principale(s) molécule(s) identifiée(s)</b>	<b>Activité</b>
Hirudine	Inhibitrice de la cascade de coagulation
Caline, apyrase, saratine, prostaglandines	Inhibitrice de l'agrégation plaquettaire
Hyaluronidase, collagénase	Facteur de diffusion
Molécules histamine-like	Vasodilatatrice
Bdelline, eglina, prostaglandines	Anti-inflammatoire
Destabilase	Antibactérienne

Tableau I : Activité des différentes molécules sécrétées par les sangsues

#### 4. Effets indésirables

Parmi les effets indésirables de l'hirudothérapie, des réactions allergiques sont le plus souvent rapportées. Parmi celles-ci, les douleurs localisées au point d'application, les démangeaisons et les dermites cutanées apparaissant dans les heures ou les jours suivants. Des gonflements au point de morsure, des rougeurs locales et, plus rarement, un choc anaphylactique peuvent aussi être observés (21, 22).

Les saignements prolongés au niveau de la plaie suivis d'une anémie sont d'autres effets indésirables fréquents (21, 22).

Le risque infectieux est un effet indésirable important (32- 34). En effet, les sangsues possèdent un microbiote intestinal et une flore mésophile. Les contaminations surviennent soit

par contact direct avec la peau ou soit, par régurgitation des bactéries (21, 22). *Aeromonas* sont, dans 2 à 20% des cas, les bactéries responsables de ces infections (32, 33). Des entérobactéries (*Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*) (35- 37) et des bactéries environnementales (*Pseudomonas*, *Ochrobacter*, *Acinetobacter* ou d'autres Bacilles à Gram négatif non fermentants) peuvent être associées (38, 39).

Des infections des tissus mous, des rejets de greffe de membres ou de lambeaux sont régulièrement observés (34, 40). Des septicémies, cellulites, myonécroses ou des fasciites nécrosantes ont également été décrites (40- 42).

Des troubles psychologiques de type malaises, peuvent survenir chez les patients ayant bénéficié de l'hirudothérapie (21).

Ces événements indésirables font l'objet d'une déclaration de pharmacovigilance.

#### 5. Contre-Indications

Les patients ayant des troubles de la coagulation sanguine (hémophilie, traitements anticoagulants ou antiagrégants plaquettaires) ne peuvent bénéficier de ce traitement en raison des risques hémorragiques accrus.

L'hirudothérapie est contre-indiquée chez les patients ayant des anémies sévères, le risque de saignement pouvant être important.

L'insuffisance artérielle du lambeau est une contre-indication à l'hirudothérapie. Elle s'oppose à l'insuffisance veineuse et se manifeste par un tissu pâle et frais au toucher avec un remplissage capillaire lent et l'absence de saignement à la piqûre d'aiguille (23, 26).

Les femmes enceintes, les patients dialysés et les sujets immunodéprimés font également partie de ceux ne pouvant bénéficier de ce type de traitement (21, 22).

#### **IV. Microbiote des sangsues et symbiose**

La symbiose du tube digestif de la sangsue médicinale est un système simple à deux symbiotes ; *Aeromonas* spp. et une bactérie de type *Rikenella* (Fig. 11) (10, 36, 43). Les *Aeromonas* ont été reconnus, pendant longtemps, comme l'unique bactérie symbiotique du microbiote de la sangsue (34, 37- 39). *Rikenella*, sont des bactéries anaérobies strictes

appartenant aux *Bacteroidetes*. *Rikenella* a été identifié, plus récemment, grâce à la méta génomique (10). Cette bactérie ne pousse pas sur les milieux de culture usuels, ce qui explique l'absence de données en ce qui la concerne (34, 37- 39).

La digestion du repas sanguin des sangsues est rendue possible par la présence d'*Aeromonas* dans le microbiote de la sangsue.

Le tube digestif des sangsues est pauvre en enzymes digestives endogènes (10), la symbiose avec *Aeromonas* va permettre de compenser ce manque d'équipement enzymatique. En effet, *Aeromonas* va apporter différentes enzymes, parmi lesquelles, des hémolysines responsables de l'hémolyse des érythrocytes ingérés par la sangsue et de leur digestion (43), reliant ainsi les physiologies des deux symbiotes dominants. Ce processus va s'instaurer lentement, pendant 6 mois à 1 an (44, 45).

Les données histologiques suggèrent la présence de mucus tapissant l'épithélium digestif des sangsues (46).

Les mucines (protéines riches en glycanes) sont les principaux composants du mucus qui protègent le tube digestif des sangsues. Ces glycanes seraient la principale source d'énergie des bactéries de type *Rikenella*, qui fermentent ces sucres en acétate, une source de carbone utilisée par les *Aeromonas* (46).

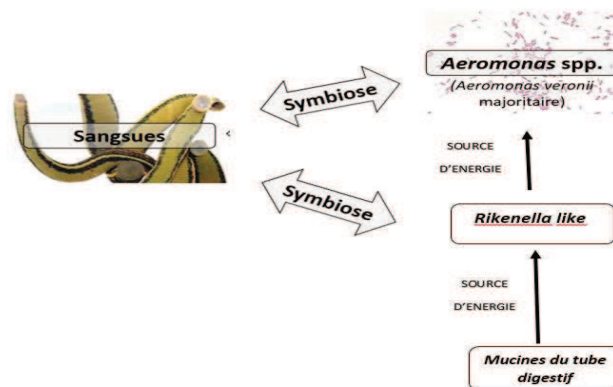


Figure 11 : Symbiose dans le tube digestif de la sangsue

## **B. Aeromonas**

Les bactéries du genre *Aeromonas* constituent la famille des *Aeromonadaceae* au sein des Gammaproteobactéries (47). Le genre *Aeromonas* est taxonomiquement complexe, mais, se divise en deux groupes principaux. Le premier est celui des souches psychrophiles, non mobiles, dont la température de croissance optimale est comprise entre 22 et 28°C. Ce groupe est représenté par *Aeromonas salmonicida* et est responsable des infections chez les poissons (Salmonidés). Le deuxième groupe d'intérêt médical, contient les *Aeromonas* mésophiles et mobiles (par exemple : *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* pour les plus connus). Ces souches se multiplient à des températures comprises entre 30 et 37 °C et sont responsables des infections chez l'homme (48).

Une trentaine d'espèces appartiennent au genre *Aeromonas*. Certaines espèces sont subdivisées en plusieurs sous-espèces (par exemple, *A. veronii* possèdent 2 sous-espèces différentes: *A. veronii biovar (bv) veronii* et *A. veronii bv sobria*).

## **I. Habitat**

*Aeromonas* sont des bactéries environnementales, ubiquitaires, retrouvées dans les habitats aquatiques (rivières, lacs, étangs, eaux de mer, eaux de boisson, eaux potables, eaux souterraines, eaux usées), les sols, les aliments (fruits de mer, volailles, légumes, produits laitiers) ou encore chez certains animaux (poissons, serpents, ours) (47, 49).

Leur prolifération est fonction des conditions de température, de pH et de la teneur en éléments nutritifs. Le nombre d'*Aeromonas* est plus élevé pendant les mois d'été en zone tempérée, et dans les pays tropicaux (50).

La contamination de l'hôte survient par contact direct via l'eau contaminée ou par ingestion de l'eau ou d'aliments contaminés.

Les activités récréatives telles que la navigation de plaisance, la pêche et la plongée peuvent être à l'origine d'une infection à *Aeromonas* lors des traumatismes majeurs (47, 49).

Les infections résultant de morsures de reptiles ou de serpents ont un lien reconnu avec le genre *Aeromonas*. Des auteurs ont rapporté des infections résultant de morsures de vertébrés moins fréquemment rencontrées, telles que celles des ours (Fig. 12).





Figure 12 : Sources environnementales des *Aeromonas* (49)

## II. Pouvoir pathogène

Les types d'infections sont extrêmement variés et surviennent majoritairement durant les mois chauds.

Les *Aeromonas* sont le plus souvent responsables d'atteintes gastro-intestinales (par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés) (Tableau II). Ces infections peuvent provoquer des syndromes cholériformes, avec des selles aqueuses, non glaireuses et plus rarement, des syndromes dysentériques avec selles sanglantes. Les *Aeromonas* peuvent être à l'origine de toxi-infection alimentaire collective (TIAC).

Les *Aeromonas* sont, également, responsables des infections cutanées à type de cellulites, fasciites nécrosantes, myonécroses ou de surinfections de plaies (47). L'importance de l'exposition hydrique a été particulièrement démontrée par les cas d'infections de plaies survenues lors de catastrophes naturelles (ouragans, tsunamis, tremblements de terre) où *Aeromonas* était un des pathogènes les plus fréquemment retrouvés (environ 20 % des cas) (51). Des blessures avec une exposition tellurique lors de jardinage (échardes ou fil de fer), de chute, ou le plus souvent d'accident de la voie publique ont, également, été rapportées.

Les infections cutanées peuvent aussi survenir suite à une morsure de serpent ou à l'hirudothérapie (50, 52).

<b>Distribution des infections (effectif total = 1852)</b>	
Gastroentérites	48,9%
Bactériémies, toutes d'origines digestives	23,7%
Infections de plaies et de tissus mous	18,4%
Infections respiratoires	2%
Infections oculaires	1%
Infections urinaires	1,5%
Infections hépatobiliaires	2,4%

Tableau II : Diversité des infections liées aux *Aeromonas* (47)

Les septicémies à *Aeromonas* sont souvent favorisées par un état d'immunodépression et par la présence d'une pathologie sous-jacente, le plus souvent d'origine digestive (atteintes hépatiques, biliaires ou pancréatiques). Cependant, les septicémies peuvent survenir chez des sujets immunocompétents (49).

Des infections pulmonaires à *Aeromonas*, après inhalation d'eau (noyades), ont été rarement observées (49).

Les autres types d'aéromonoses sont exceptionnels mais très variés, incluant des péritonites, des infections urinaires, des infections oculaires (lentilles de contact), le syndrome hémolytique et urémique (49, 51).

*A. hydrophila*, *A. veronii* et *A. caviae* sont les 3 principales espèces isolées et représentent 85 à 95% des souches impliquées dans ces infections (52).

### **III. Physiopathologie**

Les bactéries pénètrent dans l'organisme à la suite d'une effraction à la faveur d'un traumatisme ou par voie digestive (50).

Au niveau cutané, la survenue d'une infection bactérienne est la conséquence d'une altération d'un ou plusieurs mécanismes de défense : rupture de la barrière kératinocytaire (plaies, brûlures, lésions de grattage, frottements), modification du pH cutané, disparition du film sébacé, disparition de la flore bactérienne par emploi abusif de détergents ou d'antiseptiques, altération des mécanismes immunitaires (53).

Au niveau digestif, de nombreux facteurs interviennent dans la pathogénie, dont en premier lieu, ceux liés à l'hôte : hypochlorhydrie facilitant le franchissement de la barrière gastrique et la survie des *Aeromonas*, immunodéficience, cirrhose, hémopathies (50).

Deux mécanismes pathogènes sont possibles : Entéro-toxinique ou plus rarement, Entéro-invasif.

L'adhésion des *Aeromonas* au niveau des entérocytes est nécessaire pour la sécrétion des entérotoxines. Les entérotoxines sont des substances cytotoniques ou cytotoxiques (54). Les entérotoxines cytotoniques affectent les cellules épithéliales intestinales pour en altérer directement les fonctions sécrétoires. Ce type de mécanisme, responsable de diarrhées aqueuses, est le plus fréquent chez les *Aeromonas* (47, 54). En revanche, les entérotoxines cytotoxiques agissent sur l'épithélium intestinal en y provoquant des dommages histologiques importants (55).

Certaines souches d'*A. hydrophila* ou d'*A. caviae* libèrent une aérolysine ou  $\beta$ -hémolysine, qui provoquent une hémolyse en plus des lésions de l'épithélium digestif (50, 54).

Le deuxième mécanisme est un mécanisme invasif, à l'origine d'un syndrome dysentérique ou d'une colite. Le micro-organisme envahit et détruit les cellules de la muqueuse digestive responsable d'une réaction inflammatoire intense (50).

#### **IV. Facteurs de virulence**

Les *Aeromonas* possèdent des facteurs de virulence (Fig. 13) qui sont à l'origine de l'infection (47, 55, 56).

*Aeromonas* disposent d'un flagelle polaire, exprimé de manière constitutive, responsable d'un mouvement de type nage ou « swimming » dans les milieux liquides. Les bactéries pourront ainsi atteindre les différentes cibles (cellules épithéliales, cellules intestinales ou érythrocytes) et y adhérer grâce à différentes structures de surface (par exemple : pili de type I et IV) (47, 56).

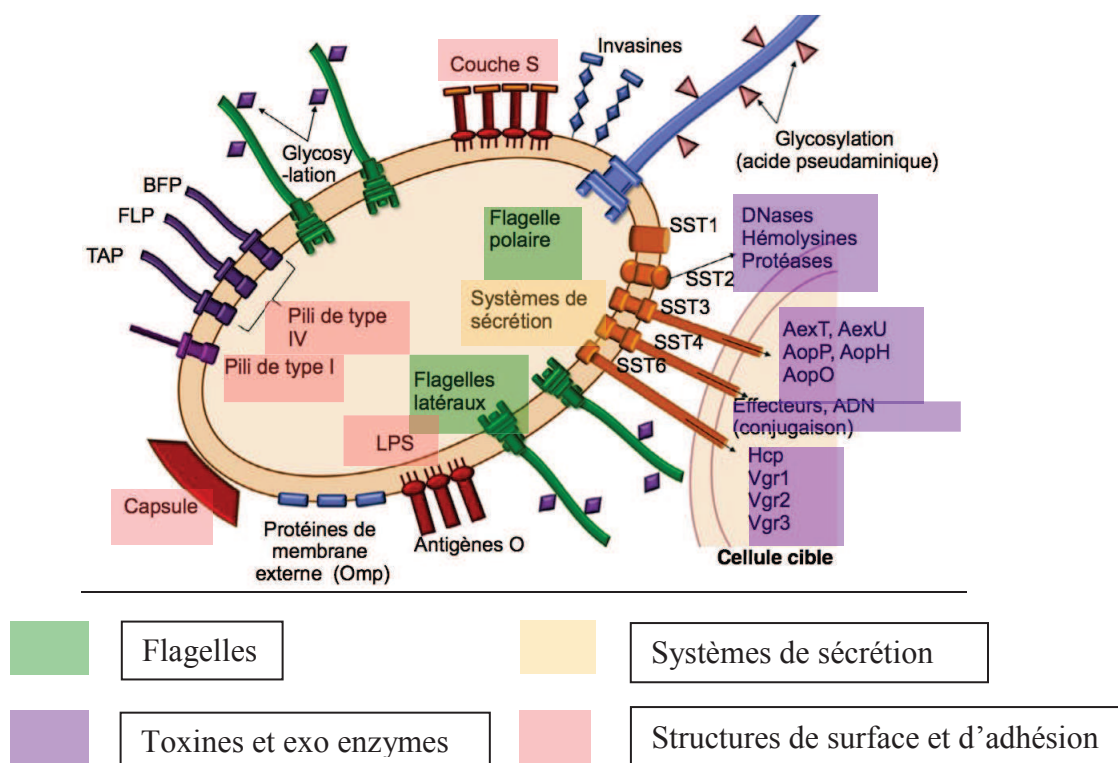


Figure 13 : Facteurs de virulence des *Aeromonas* (48)

*Aeromonas* possèdent, en plus, un système flagellaire latéral qui s'exprime dans environ 60% des cas. L'expression des flagelles latéraux est inductible chez *Aeromonas*, ils sont produits dans un environnement visqueux ou au niveau des surfaces solides et exercent une motilité par un mouvement de type « essaimage ». Ce système de flagelles serait responsable d'une augmentation de l'adhésion aux cellules cibles et de la formation des biofilms (57, 58).

Les pili de type IV sont des structures filamenteuses que l'on retrouve à la surface des bactéries. Ces structures, dont l'expression est inductible, sont longues (4 à 7  $\mu\text{m}$ ) et flexibles, présentes en nombre limité (environ 20). Ces pili, en plus d'avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire, sont également impliqués dans le transfert d'acide désoxyribonucléique (ADN), la formation de biofilm et l'agrégation cellulaire (57, 58).

Les pili de type I (pili communs) sont produits de manière constitutive. Ils sont plus courts (0,5 à 2  $\mu\text{m}$ ), rigides et présents en grand nombre autour de la bactérie. Leur principal rôle est l'adhésion cellulaire (57).

Les LPS jouent un rôle important dans l'organisation et le maintien de la membrane externe. Ils sont reconnus par les Toll Like Receptor 4 (TLR4), présents à la surface des

cellules immunitaires, responsables de la production des cytokines et par conséquent d'une réponse inflammatoire non spécifique et antibactérienne (47, 54).

La couche de surface est une structure paracrystalline composée d'un seul type de protéine recouvrant la paroi bactérienne (Vap A ou Virulence array protein A). Cette couche protège les bactéries de l'action des protéases, du stress oxydatif, du sérum, de la phagocytose en empêchant l'opsonisation, et possède également des propriétés d'adhésion cellulaire liées à son hydrophobicité (57, 59).

La capsule est une structure polysaccharidique qui recouvre la membrane externe des bactéries. Il s'agit d'un important facteur de virulence résistant à la phagocytose et au système du complément (47). Néanmoins, elle n'est synthétisée que par les espèces qui ne sont pas responsables d'infections humaines (*A. salmonicida*) (54).

Il existe plusieurs systèmes de sécrétion chez les *Aeromonas*, responsables du transport des facteurs de virulence. Parmi ces systèmes, le système de sécrétion de type II (T2SS) est une voie de sécrétion générale qui sécrète des facteurs extracellulaires, dont certains sont impliqués dans la virulence tels que les DNases, les protéases, les amylases et la principale hémolysine (aérolysine). Les systèmes de sécrétion de type III et VI (T3SS, T6SS) sont associés à la virulence et sont capables d'injecter des effecteurs protéiques directement dans le cytoplasme de la cellule cible, en une seule étape (56, 60). Le T3SS apparaît comme un facteur de virulence majeur des souches d'*Aeromonas* en rapport avec la toxicité des effecteurs qu'il sécrète (AexT, AexU, AopP, AopH et/ou AopO). Ces toxines sont responsables d'effets cytotoxiques (57).

En fonction des conditions environnementales et des signaux extracellulaires, les *Aeromonas* peuvent former des biofilms ou réagir à la densité de cellules bactériennes (*quorum sensing*) (47, 61). Les signaux sont présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes (61).

Le biofilm protège les bactéries du système immunitaire de l'hôte, de la dessiccation, des antibiotiques et des désinfectants (62).

Le *quorum sensing* est un mode de communication intra et inter-espèces bactériennes, à l'origine de l'expression de plusieurs types de gènes en l'occurrence les gènes codant l'émission de la bioluminescence, la sporulation, la compétence, la résistance aux

antibiotiques, la sécrétion de facteurs de virulence, la production de pigments et la formation de biofilm (63).

## V. Caractères bactériologiques

### 1. Morphologie

*Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent mobiles par ciliature polaire monotriche (espèces impliquées dans les infections humaines) ou immobiles (*A. salmonicida*).

### 2. Caractères culturaux

Bactéries aéro-anaérobies facultatives, la croissance est obtenue en atmosphère ordinaire sur milieux non sélectifs ou sur milieux sélectifs des entérobactéries : géloses Mac Conkey (MCK) ou Drigalski.

En 24 heures d'incubation, sur géloses au sang (GS), les colonies sont souvent  $\beta$ -hémolytiques (*A. hydrophila* et *A. veronii*), de 2 à 3 mm de diamètre, lisses, régulières, de couleur grise et d'aspect muqueux (Fig. 14a). La GS peut être rendue sélective par ajout de 20 à 30  $\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline, concentration à laquelle les *Aeromonas* sont résistants (sauf *A. trota*).

Sur milieux chromogéniques (Chromogenic Peptide Substrate (CPS)), les colonies sont de couleurs rose pâle à bordeaux (Fig. 14b).

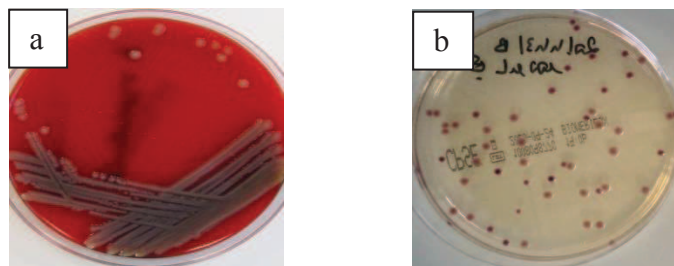


Figure 14 : Aspects des colonies d'*A. hydrophila* sur a- GS et b- CPS

### 3. Caractères biochimiques

Les *Aeromonas* sont dotés d'une oxydase, d'une catalase, ils fermentent le glucose avec ou sans production de gaz et sont résistants au composé vibriostatique O/129 (49). Cette résistance permet un diagnostic différentiel avec le genre *Vibrio*.

Les méthodes basées sur les profils biochimiques conventionnels (API 20NE, Vitek) ne sont pas efficaces pour une identification précise des espèces d'*Aeromonas*.

L'identification d'espèce, basée sur le phénotype de résistance aux  $\beta$ -lactamines, n'est pas toujours efficace du fait de la grande diversité des profils (64, 65).

Le séquençage du gène de l'acide ribonucléique ribosomique de sous-unité 16S (ARN16S) ne permet pas toujours une identification précise à l'espèce en raison de la similarité des séquences, différant parfois de seulement quelques nucléotides entre les espèces. Actuellement, la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Brüker) est l'outil le plus puissant pour l'identification des *Aeromonas*. Avec les dernières bases de données disponibles sur le marché, le taux d'identification correcte à l'espèce dépasse les 90% (64, 65). La principale limite de cette méthode est la nécessité de mettre à jour la base de données pour inclure les nombreuses espèces manquantes, comme *A. dhakensis* ou les nouvelles espèces (*A. intestinalis*, *A. enterica*, et *A. aquatilis*) (64, 65).

#### 4. Interprétation clinique

La signification clinique de l'isolement des *Aeromonas* dépend du site infectieux, de leur présence en culture monomorphe ou polymorphe.

*Aeromonas* doit être considéré comme pathogène s'il est isolé dans des sites normalement stériles (prélèvements péritonéaux, ascites, pleuraux ou péricardiques), des plaies superficielles, des tissus mous, ou après application de sangsues.

Dans les infections gastro-intestinales, *Aeromonas* est impliqué dans le processus pathologique s'il est isolé en quantité importante ou modérée dès la phase aiguë de la maladie. Dans les prélèvements respiratoires, *Aeromonas* est considéré comme témoin d'une colonisation des voies respiratoires sauf dans les cas d'affections sous-jacentes ou de pneumonies (50).

## VI. Sensibilité aux antibiotiques

### 1. Sensibilité aux Béta-lactamines

La résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines est associée à la production d'une à 3  $\beta$ -lactamases de classe B, C et D d'Ambler, d'origine chromosomique, de type inductible (66, 67).

La sensibilité des *Aeromonas* aux  $\beta$ -lactamines varie d'une espèce à l'autre :

- Le phénotype pénicillinase est dû à une  $\beta$ -lactamase de classe D ou oxacillinase. Elle confère la résistance aux aminopénicillines et à la ticarcilline. Cette oxacillinase est faiblement ou non inhibée par l'acide clavulanique et le tazobactam. Toutes les souches d'intérêt médical peuvent exprimer cette  $\beta$ -lactamase, à l'exception d'*A. trota* (Tableau III).
- Une céphalosporinase de type *Amp C*, de classe C d'Ambler, confère une résistance à la céfalotine. Cette céphalosporinase est peu active sur la céfoxitine et le céfotaxime en l'absence d'induction (68, 69). Les *Aeromonas* porteurs du gène *Amp C* n'expriment pas toujours la céphalosporinase et peuvent même présenter une sensibilité à la céfalotine. Les mécanismes impliqués dans l'expression de ce type de  $\beta$ -lactamase comprennent l'induction d'une  $\beta$ -lactamase en présence d'inducteurs appropriés (céfoxitine ou imipénème) ou le développement d'une mutation qui conduit à la production constitutive d'une  $\beta$ -lactamase de haut niveau (68). Les  $\beta$ -lactamases de type *Amp C* sont retrouvées chez *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. trota* (69).
- La carbapénémase de type métallo  $\beta$ -lactamase (MBL), de classe B confère une résistance aux carbapénèmes (68). La MBL la plus couramment mentionnée chez les espèces *Aeromonas* est la *CphA*, active sur les carbapénèmes uniquement, mais pas sur les pénicillines et les céphalosporines. La répartition de la *CphA* parmi les *Aeromonas* est spécifique d'espèce (*A. hydrophila*, *A. veronii* et *A. jandaei*), mais absente chez *A. caviae*. Les *Aeromonas* sont naturellement résistants à l'ertapénème.

Plus rarement, les *Aeromonas* peuvent acquérir une  $\beta$ -lactamase de classe A de type BLSE ( $\beta$ -Lactamase à Spectre Étendu) (66). Contrairement aux carbapénémases de classe B et aux  $\beta$ -lactamases de type *Amp C*, codées par les chromosomes, l'acquisition des gènes BLSE chez les *Aeromonas* peut résulter d'un transfert horizontal de gènes entre les *Aeromonas* et les bactéries coexistantes dans les microenvironnements aquatiques (70).

Les *Aeromonas* (sauf *A. trota*) sont ainsi résistants à l'amoxicilline (dans plus de 90 %), à l'amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline (dont la résistance est mal récupérée par l'acide clavulanique), aux céphalosporines de première génération pour les *Aeromonas*



exprimant le gène *Amp C*. Ils sont en général sensibles aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et aux carbapénèmes (51).

	Chromosomique			Acquis
	Classe B (MBL)	Classe C ( <i>Amp C</i> )	Classe D (pénicillinase)	Classe A (BLSE)
<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+
<i>A. caviae</i>	-	+	+	-
<i>A. veronii</i> <i>bv sobria</i>	+	-	+	-
<i>A. trola</i>	-	+	-	-

+ = présent; - = absent

Tableau III : Mécanismes de résistance des principales espèces d'*Aeromonas*

## 2. Sensibilité aux autres familles d'antibiotiques

Les *Aeromonas* sont habituellement sensibles aux fluoroquinolones, aux aminosides (sauf la tobramycine qui est inconstamment sensible), au cotrimoxazole et aux cyclines (50). Ces molécules sont celles recommandées par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie / European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (CA-SFM/EUCAST) pour le traitement des *Aeromonas*. Les *Aeromonas* sont aussi sensibles à la colistine (sauf *A. jandaei* et *A. hydrophila*) (69).

## VII. Activité des antiseptiques

Il existe plusieurs classes d'antiseptiques actifs sur les *Aeromonas*. Parmi les plus connus, les alcools (éthanol), les biguanides (chlorhexidine), les halogénés chlorés (eau de javel, Dakin®), les halogénés iodés (povidone (PVP)-iodée, Bétadine®) et les oxydants (eau oxygénée) (71).

La chlorhexidine est un antiseptique bactériostatique à faible concentration et bactéricide à une concentration supérieure à 0,12% (72).

Les autres antiseptiques sont bactéricides et efficaces sur les *Aeromonas*.

Les halogénés et les oxydants ont un spectre d'action plus large (virus et champignons) (71).

Le délai d'action des antiseptiques est variable, la chlorhexidine alcoolique 2% est active en 30 secondes tandis que la chlorhexidine 0,2% aqueuse est active à partir de 5 minutes. Les autres antiseptiques sont actifs en une minute (73).

Le principal avantage de la chlorhexidine et la PVP-iodée est la présence d'un effet rémanent. Cet effet persiste pendant 1 à 4 heures pour la chlorhexidine, alors que pour la PVP-iodée, il dure environ 3 heures. Les autres antiseptiques n'ont pas d'effet rémanent (74). L'effet rémanent est favorisé par le séchage à l'air et l'absence de rinçage (75).

Un autre intérêt à l'utilisation des antiseptiques est l'absence de résistance bactérienne (72).

Cependant, pour la sangsue, la chlorhexidine peut être neurotoxique à une concentration supérieure à 0,02%, les dérivés chlorés peuvent être néfastes en raison de leur odeur de chlore (72- 74).

## **TRAVAIL PERSONNEL**

## **A. Cas clinique**

En décembre 2017, une femme de 58 ans a été admise, dans le service de chirurgie plastique et reconstructive du CHU d'Amiens, pour une reconstruction mammaire unilatérale après une mastectomie.

Une congestion veineuse du lambeau a été observée dès le premier jour ce qui a conduit à un recours aux sangsues.

Un total de 25 sangsues a été appliqué et, une prophylaxie par voie orale à base de triméthoprim / sulfaméthoxazole (80 mg / 400 mg) et d'ofloxacine (200 mg) a été mise en place pour une durée de 5 jours.

L'hirudothérapie a été efficace et l'apparence du lambeau s'est rapidement améliorée. Cependant, une anémie (hémoglobine : 8,5 g/dL) a été détectée au 6ème jour, nécessitant une transfusion de deux culots globulaires érythrocytaires.

Un mois plus tard, la patiente s'est présentée et a été admise de nouveau dans le même service pour une nécrose partielle du lambeau associée à la présence de suppuration au niveau de la cicatrice de la mastectomie.

Un débridement chirurgical a été effectué, et une reconstruction à l'aide d'un nouveau lambeau (muscle grand dorsal) a été réalisée.

Le bilan inflammatoire, au préalable, a montré une protéine C-réactive à 151 mg / L et une hyperleucocytose à  $30.10^3$  leucocytes / mm<sup>3</sup>.

Trois échantillons peropératoires (prélèvement péri-prothétique, plaie, liquide de drainage) ont été envoyés au laboratoire pour une analyse bactériologique.

Les examens microscopiques de ces échantillons ont montré de nombreux polynucléaires neutrophiles et de nombreux bacilles à Gram négatif.

Les cultures sur GS, incubées en atmosphère aérobie à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , ont permis d'isoler des colonies d'*A. hydrophila* qui ont été identifiées par Spectrométrie de masse (MALDI-TOFF, Brüker) avec un score supérieur à 2.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques par méthode de diffusion en gélose, réalisés selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2016, ont révélé que les souches étaient résistantes à la ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, pipéracilline, pipéracilline + tazobactam, céfotaxime, céfépime, et à l'aztréonam, mais sensibles à la ceftazidime (Concentration

Minimale Inhibitrice (CMI)= 1 mg / L), l'imipénème (CMI= 0,38 mg / L) et au méropénème (CMI= 0,5 mg / L).

Le test de synergie entre les C3G et l'amoxicilline + acide clavulanique était positif, suggérant ainsi la production d'une BLSE (Fig. 15).

Une résistance associée à la ciprofloxacine (8,0 mg / L) et au triméthoprim / sulfaméthoxazole (32 mg / L), molécules utilisées comme antibioprofylaxie a, également, été décelée.

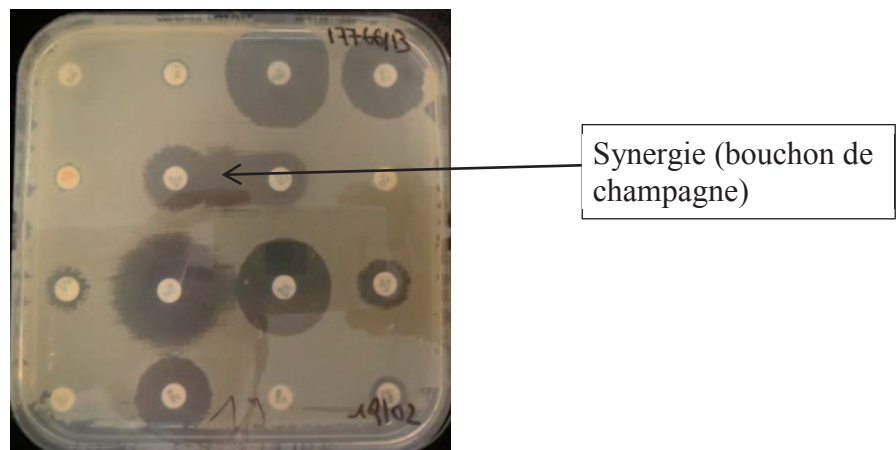


Figure 15 : Antibiogramme d'*A. hydrophila* BLSE

Une antibiothérapie intra-veineuse (IV) avec ceftazidime (6 g/jour pendant 10 jours) et gentamicine (80 mg/ jour pendant 2 jours) a été initiée conduisant à une amélioration clinique.

Ce cas nous a poussé à rechercher l'origine de l'infection par l'*A. hydrophila* BLSE. L'utilisation des sangsues a été la première piste explorée. Une analyse bactériologique de l'eau de conservation des 4 lots de sangsues disponibles à la pharmacie du CHU, a alors été effectuée.

Des membranes filtrantes composées d'esters de cellulose de porosité 0,45µm de diamètre, d'environ 47 mm de diamètre et munies d'une grille-repère ont été utilisées, pour la mise en culture de 1 mL d'eau de conservation (Fig. 16). De l'eau physiologique stérile (100 mL) a été utilisée comme témoin négatif.

Une analyse bactériologique de l'eau minérale (Cristaline®) utilisée à la pharmacie, pour le renouvellement de l'eau de conservation, a été, également, réalisée.

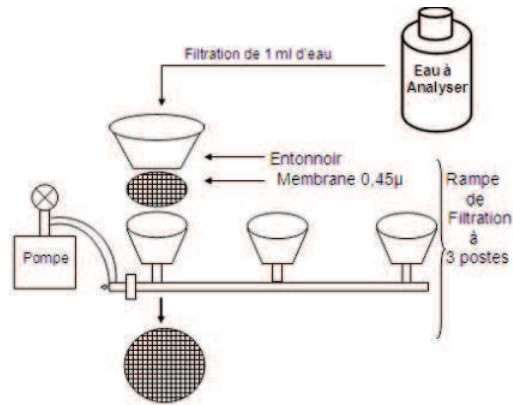


Figure 16 : Ensemencement par filtration de l'eau de conservation

Les milieux de culture utilisés étaient des GS et CPS. Ces géloses ont été incubées pendant 24 heures à une température de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , en atmosphère aérobie, conformément aux recommandations du fournisseur.

L'ensemencement de l'eau de conservation des 4 lots a été réalisé à deux reprises après l'échantillonnage pour la reproductibilité.

Pour chaque lot, une culture en nappe a été obtenue, rendant impossible la numération bactérienne (Fig. 17). Plusieurs espèces bactériennes ont été identifiées ; *Aeromonas* (principalement *A. veronii* et *A. hydrophila*), des entérobactéries (*M. morgani*, *C. freundii*) et *Carnobacterium maltaromaticum*, bactérie de l'environnement (Tableau IV) (Fig. 18).

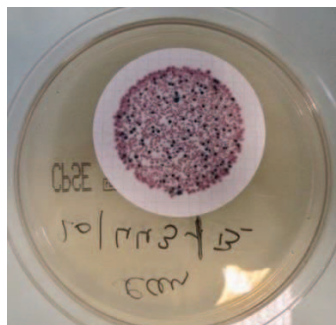


Figure 17 : Culture en nappe de l'eau de conservation

Date	Différents lots d'eau de conservation analysés	Bactéries retrouvées majoritairement dans la nappe bactérienne
Période de Décembre 2017 à Janvier 2018	17766/B	<i>A. hydrophila</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i>
	17685/B	<i>A. veronii bv veronii</i> , <i>A. ichthiosmia</i> , <i>C. maltaromaticum</i>
	17622/B	<i>A. veronii bv veronii</i> , <i>M. morganii</i>
	17762/B	<i>A. veronii bv veronii</i> , <i>M. morganii</i>

Tableau IV : Ecologie bactérienne des eaux de conservation de 4 lots de sangsues

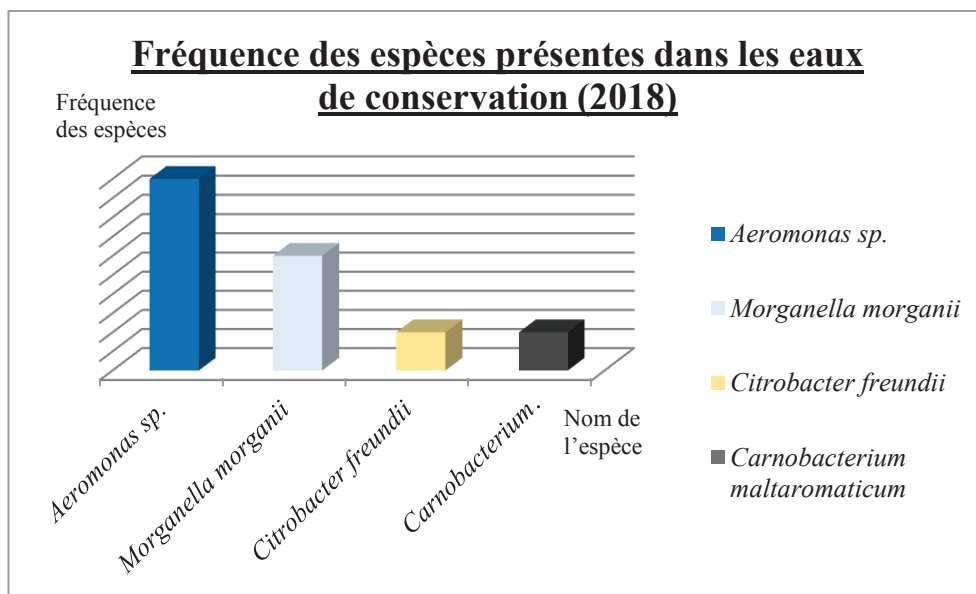


Figure 18 : Espèces isolées des eaux de conservation et leur fréquence d'apparition

Des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés sur les différentes espèces isolées des eaux de conservation.

Parmi les souches d'*Aeromonas* isolées, des colonies d'*A. hydrophila* avec le même phénotype de résistance que celui isolé chez la patiente ont été détectées.

Les autres espèces d'*Aeromonas* (*veronii bv veronii* et *ichthiosmia*) exprimaient une pénicillinase naturelle (Tableau IV).

Parmi les entérobactéries, *C. freundii* et *M. morgani* avaient un phénotype sauvage (céphalosporinase naturelle) et une souche de *M. morgani* exprimait une résistance associée au cotrimoxazole (Tableau V).

Bactéries retrouvées	Nombre d'espèce isolée	Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	Résistance cotrimoxazole (%)	Résistance fluoroquinolones (%)
<i>C. freundii</i>	1	Céphalosporinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. veronii</i> bv <i>veronii</i>	3	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>M. morgani</i>	3	Céphalosporinase naturelle de bas niveau	33,3	0
<i>A. ichthiosmia</i>	1	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. hydrophila</i>	1	BLSE	100	100

Tableau V : Phénotypes de résistance des espèces isolées

Une analyse moléculaire complémentaire (Polymerase Chain Reaction (PCR) et séquençage) de la souche d'*A. hydrophila* BLSE isolée chez la patiente et de la souche isolée dans l'eau de conservation des sangsues a révélé que les 2 souches sont génétiquement identiques avec la présence de deux  $\beta$ -lactamases (TEM-1 et CTX-M-3).

L'analyse bactériologique de l'eau minérale s'est avérée négative.

Ce cas clinique a fait l'objet :

- D'une déclaration de pharmacovigilance.
- D'une publication dans la revue « Clinical Microbiology and Infection » [Annexe 2] (76).
- D'une présentation orale à la journée de pharmacovigilance de Picardie, 17 Octobre 2019.



Plusieurs points ont suscité notre curiosité :

Quelle est l'origine de la présence de cette bactérie multirésistante dans l'eau de conservation d'un médicament, au sein de la pharmacie d'un CHU ?

Existe-t-il une traçabilité des lots de sangsues à la pharmacie du CHU d'Amiens-Picardie (date de livraison, durée maximale de conservation et numéro de lots) ?

Existe-t-il une surveillance bactériologique de l'eau de conservation des sangsues au CHU d'Amiens-Picardie ?

Une décontamination des sangsues est-elle effectuée avant dispensation dans le service clinique ou, éventuellement, avant utilisation ?

Toutes ces questions sont restées sans réponse.

Aucune traçabilité des lots de sangsues n'a été retrouvée. Cependant, suite au cas clinique, une action corrective a été, immédiatement, mise en place par les praticiens de la pharmacie. Tous les lots de sangsues disponibles ont été éliminés et une nouvelle commande a été réalisée avec mise en place d'une traçabilité.

## **B. Etude rétrospective de l'utilisation de l'hirudothérapie au CHU d'Amiens-Picardie sur une période de 9 ans**

Le cas clinique précédent a été à l'origine de notre intérêt pour le sujet.

Une étude rétrospective des infections liées à l'hirudothérapie a été menée sur une période de 9 ans (période de 2010 à 2018), au CHU Amiens-Picardie.

### **Objectif :**

Etude des caractéristiques démographiques, cliniques et bactériologiques des infections à *Aeromonas* spp. liées à l'hirudothérapie.

### **Méthodes :**

Etude monocentrique rétrospective portant sur les patients traités par l'hirudothérapie au CHU d'Amiens-Picardie pendant une période de 9 ans (Janvier 2010 à Décembre 2018).

Un recueil des données a été colligé à la pharmacie du CHU: caractéristiques démographiques des patients (sexe, âge), la présence éventuelle de comorbidités, l'indication à l'hirudothérapie, le nombre de sangsues utilisées et la durée, le service prescripteur et l'antibioprophylaxie éventuelle.

En cas d'infection, la date, la nature du prélèvement, et les données bactériologiques (identification de l'espèce et la sensibilité aux antibiotiques) ont été analysées.

D'autres données, lorsqu'elles étaient disponibles, ont été relevées comme la présence éventuelle de complications, l'évolution clinique, le traitement antibiotique.

Trois groupes de patients ont été identifiés : patients non infectés par l'hirudothérapie, patients ayant présenté une infection à *Aeromonas* et patients infectés par d'autres bactéries.

Une analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, Paris, France), et la *p-value* pour la comparaison des fréquences relatives a été estimée à l'aide d'un test Khi2.

Un seuil  $p < 0,05$  a été considéré comme significatif.

### **Résultats :**

Trente-sept patients ont bénéficié de l'hirudothérapie pendant la période de l'étude au CHU Amiens- Picardie.

L'âge moyen était de 47.5 ans (12- 84 ans) avec une prédominance masculine (sex-ratio M/F= 1.46).

Les services prescripteurs de l'hirudothérapie étaient, par ordre de fréquence, la chirurgie orthopédique (37,8%), la chirurgie plastique (32,4%) et la CMF (27%) (Tableau VI).

Les indications principales étaient la reconstruction par lambeau du sein ou de la jambe et la réimplantation de doigts.

Le nombre moyen de sangsues utilisées par patient était de 37 (8- 126) pour une durée moyenne du traitement de 4 jours (1- 12 jours) (Tableau VI).

Une antibioprofylaxie, dont la nature varie en fonction du service, a été mise en place dans 86.4%. En chirurgie orthopédique, l'antibioprofylaxie utilisée était le plus souvent à base d'amoxicilline ou d'amoxicilline + acide clavulanique (50% des cas). En chirurgie plastique, l'association cotrimoxazole et fluoroquinolones était utilisée dans 41,6% des cas. En chirurgie maxillo-faciale, les fluoroquinolones seules étaient utilisées dans 30% des cas.

Le taux global de patients infectés était de 40,5%. Le taux varie en fonction du service ; 20% dans le service de CMF, 28,6% en chirurgie orthopédique et 66,6% dans le service de chirurgie plastique (Tableau VI).

Le taux global de réussite de l'hirudothérapie était de 62,2%. Ce taux varie de 57,1% à 70% pour le service de chirurgie orthopédique et de CMF, respectivement (Tableau VI).

Services	Nombre de patients	Moyenne du nombre de sangsues/ service	Moyenne de la durée du traitement en jours	Moyenne du nombre de sangsues/ patient/ jour	Taux de réussite de l'hirudothérapie (%)	Taux de patients infectés (%)
Chirurgie plastique	12	40 [10-105]	4,9 [2 -7]	8,16	58,3	66,6
Chirurgie maxillo-faciale	10	36,2 [10-90]	3,1 [1-5]	11,67	70	20
Chirurgie orthopédique	14	35,1 [8-126]	5,43 [2-12]	6,46	57,1	28,6
Soins intensifs	1	35	4	8,75	100	100
<b>Total</b>	37	37 [8-126]	4 [1-12]	9,25	62,2	40,5

Tableau VI : Analyse de la prescription des sangsues médicinales au CHU Amiens-Picardie entre 2010 et 2018

Parmi les 37 patients ayant bénéficié de l'hirudothérapie, 64,8 % ont présenté une anémie avec un taux moyen d'hémoglobine à 8,5 g/dL (6- 11,1). Une transfusion sanguine était nécessaire chez 54% des patients (Tableau VII).

Dans 40,5% des cas, des patients ont bénéficié d'une hirudothérapie alors qu'ils étaient immunodéprimés.

Quinze patients (40,5%) ont présenté une infection dont 10 (66,6%) à *Aeromonas*. L'infection est apparue en moyenne 15 jours après l'hirudothérapie (5- 30 jours).

Parmi les *Aeromonas*, *A. hydrophila* était l'espèce la plus fréquente (60%) suivie d'*A. veronii* (20%) et *Aeromonas* spp. (20%).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Aeromonas* a montré une résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique dans 100% des cas, aux C3G dans 10%, aux fluoroquinolones dans 30% et au cotrimoxazole dans 10% des cas. Une résistance aux aminosides a été relevée dans 50% des cas pour la tobramycine et 10% pour la gentamicine.

Le taux de réussite du traitement passait de 62,2 à 20% en cas d'infection à *Aeromonas*.

Le temps de séjour à l'hôpital passait de 13,3 jours à 14,8 jours en cas d'infection à *Aeromonas*.

Parmi les 3 groupes identifiés, l'infection à *Aeromonas* était liée au nombre de sangsues utilisées, à la durée de l'hirudothérapie et à un séjour prolongé à l'hôpital, mais non statistiquement significatif (Tableau VII).

Cependant, un échec de la reconstruction par lambeaux est statistiquement lié à une infection à *Aeromonas*,  $p = 0,006$  (Tableau VII).

	<b>Absence d'infection (N=22)</b>	<b>Infections à <i>Aeromonas</i> (N=10)</b>	<b>Infections à d'autres bactéries (N=5)</b>	<i>p-value</i>
<b>Sexe ratio (M/F)</b>	1,2	2,33	1,5	0,687
<b>Moyenne d'âge (+/- écart-type)</b>	49,18 +/- 3,842	44,1 +/- 4,722	47,4 +/- 3,763	0,467
<b>Immunodépression (Cancer, VIH...) (%)</b>	40,9	40	40	0,676
<b>Nombre moyen de sangsues utilisées (+/- écart-type)</b>	34,90 +/- 6,543	39,2 +/- 10,510	47 +/- 12,510	0,507
<b>Durée moyenne de l'hirudothérapie en jours (+/- écart-type)</b>	4,18 +/- 0,619	5,5 +/- 0,671	4,6 +/- 0,678	0,243
<b>Anémie (%)</b>	54,5	80	80	0,281
<b>Transfusion (%)</b>	41,7	62,5	75	0,316
<b>Succès de l'hirudothérapie (%)</b>	77,3	20	80	0,006
<b>Durée de séjour à l'hôpital en jours (+/- écart-type)</b>	12,68 +/- 2,645	14,8 +/- 3,235	13 +/- 2,074	0,684
<b>Prescription d'une antibioprofylaxie (%)</b>	90,9	80	80	0,824

Tableau VII : Caractéristiques de la cohorte étudiée

En résumé, les infections à *Aeromonas* sont à redouter en cas d'infection liée à l'hirudothérapie. Un lien fort a été établi entre l'infection à *Aeromonas* et l'échec de l'hirudothérapie.

Un point à soulever dans cette étude est l'utilisation de l'hirudothérapie chez le patient immunodéprimé (40%), au CHU. Or, l'immunodépression est une contre-indication.

Cette étude rétrospective a fait l'objet d'une communication Européenne [Annexe 3] et un article a été rédigé et soumis.

Les résultats des deux études précédentes nous ont poussés à réfléchir à la mise en place des bonnes pratiques d'utilisation des sangsues au CHU Amiens-Picardie : traçabilité, protocole de changement de l'eau, contrôle bactériologique de l'eau de conservation, décontamination externe des sangsues avant dispensation. Cette réflexion représente la troisième partie du travail personnel de cette thèse.

## **C. Proposition d'un protocole d'analyse bactériologique de l'eau de conservation**

### **Objectifs :**

Etablir un protocole d'analyse bactériologique des eaux de conservation des sangsues, reflet de la flore bactérienne présente chez l'animal.

Etablir une périodicité de changement de l'eau de conservation en fonction de la charge bactérienne.

### **Matériels et méthodes :**

Cette partie de l'étude a été réalisée pendant la période allant de Septembre 2019 à Octobre 2019.

Deux lots de sangsues étaient alors disponibles à la pharmacie du CHU (Fig. 19).

Les résultats des cultures en nappe des eaux de conservation lors du cas clinique de 2017 nous ont conduits à proposer un nouveau protocole.



Figure 19 : Lots de sangsues

### **1. Culture-numération**

La culture-numération a été réalisée par étalement de 100  $\mu$ L sur plusieurs milieux de culture (GS, CPS, MCK), à partir d'un échantillonnage de 100 mL d'eau (Fig. 20).

Chaque culture-numération a été réalisée à 2 reprises (reproductibilité).

Les géloses ont été incubées pendant 24-48 heures à une température de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , en atmosphère aérobie, conformément aux recommandations du fournisseur.

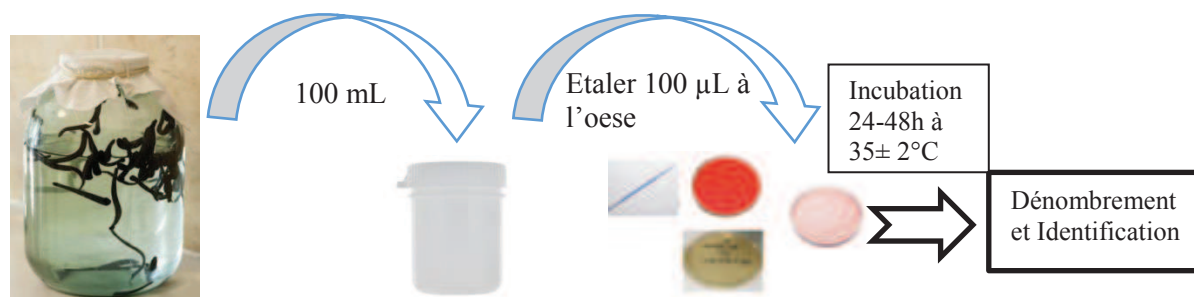


Figure 20 : Ensemencement de l'eau de conservation

## 2. Identification des bactéries isolées

L'identification des colonies fraîchement isolées a été réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF-MS (Bruker Biotyper).

Le spectromètre de masse est couplé à un logiciel dédié à l'interprétation des spectres protéiques obtenus. Le résultat obtenu est un ensemble de pics ou spectre de masse représentant les rapports masse/charge ( $m/z$ ) des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'intensité relative de ces ions selon l'axe des ordonnées.



Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données fournie par Bruker.

Le résultat de l'identification apparaît sous la forme d'un score de corrélation entre le spectre obtenu et le spectre de référence le plus proche identifié. Le score est compris entre 0 et 3.

Un score  $>2$  confère une identification à l'espèce, un score entre 1,7 et 1,99 une identification au genre, un score  $< 1,7$  ne permet pas une identification en l'état de la souche considérée.



### 3. Tests de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogrammes)

Les antibiogrammes ont été réalisés par méthode de diffusion en gélose, conformément aux recommandations CA-SFM/EUCAST 2018.

Une suspension bactérienne en solution salée de turbidimétrie équivalente à 0.5 McFarland a été préparée à partir d'une culture de 24 heures. L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST.

Le dépôt des disques est effectué 15 minutes après ensemencement des milieux. Les antibiogrammes sont incubés à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en aérobiose pendant  $20 \pm 4\text{h}$ .

La sensibilité aux molécules d'antibiotiques d'usage commun chez l'homme, figurant sur la liste standard du CA-SFM/EUCAST 2018 a été testée.

Les diamètres critiques référencés par CA-SFM/EUCAST 2018 ont permis de catégoriser les isolats.

#### **Résultats :**

Plusieurs espèces bactériennes ont été identifiées sur les 2 lots d'eau de conservation, dont des *Aeromonas*, des entérobactéries et des bactéries environnementales (Tableau VIII).

Date	Lots de l'eau de conservation analysés	Bactéries retrouvées	Espèce prédominante
Septembre – Octobre 2019	19486/A	<i>A. veronii bv sobria</i> , <i>C. gilenii</i> , <i>C. maltaromaticum</i> , <i>A. veronii bv veronii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>A. veronii bv sobria</i>
	19585/B	<i>A. veronii bv sobria</i> , <i>C. gilenii</i> , <i>A. veronii bv veronii</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>A. veronii bv sobria</i>

Tableau VIII : Résultats bactériologiques des eaux de conservation des sangsues

Les *Aeromonas*, donnent des colonies productrices de  $\beta$ -glucuronidase, colorées en rose avec un contour blanchâtre sur le milieu CPS (Fig. 21).

La taille des colonies est variable en fonction de l'espèce d'*Aeromonas* :

- Petites pour *A. veronii* *bv sobria*.
- Grosses pour *A. veronii* *bv veronii* ou *A. hydrophila*.

Les *Citrobacter* donnent des colonies productrices de  $\beta$ -glucosidase colorées en vert à brun-vert avec un contour blanchâtre. Elles sont muqueuses aux contours irréguliers.

Les espèces du genre *Pseudomonas* donnent des colonies transparentes.

Les colonies de *Shewanella putrefaciens* apparaissent colorées en orange.

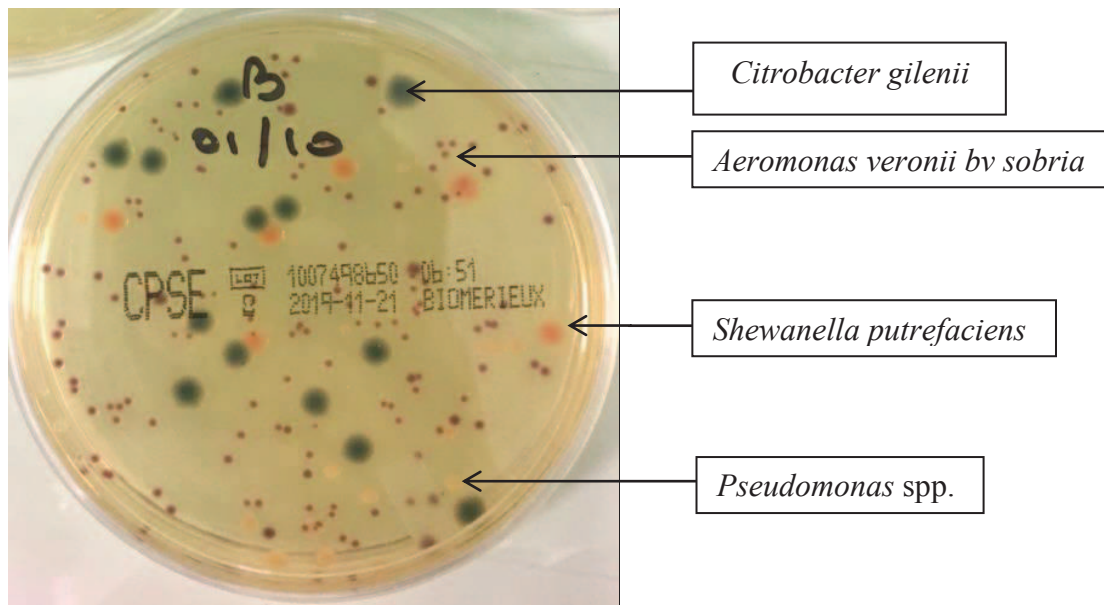


Figure 21 : Résultat de culture de l'eau de conservation sur CPS

Chaque culture-numération a été réalisée à 2 reprises et une moyenne a été effectuée.

Le milieu CPS, grâce aux capacités métaboliques des bactéries a permis de réaliser une numération aisée de chaque aspect de colonies.

Le dénombrement des colonies est réalisé en UFC (Unité formant colonie) /mL (Tableau IX).

Espèces	Nombre moyen de colonies	Numération (UFC/mL) du lot B
<i>A. veronii bv sobria</i>	125	1250
<i>C. gilenii</i>	13	130
<i>Pseudomonas spp.</i>	20	200
<i>S. putrefaciens</i>	6	60

Tableau IX : Numération des colonies de la figure 21

Les bactéries identifiées en majorité et retrouvées dans chaque échantillonnage d'eau, étaient *Aeromonas veronii bv sobria* et *Citrobacter gilenii*. La numération moyenne de ces 2 bactéries en fonction de la périodicité des renouvellements d'eaux a été réalisée.

Les changements d'eaux avaient lieu 3 fois par semaine. Les jours, où le renouvellement de l'eau a été effectué, sont indiqués sur la figure 22.

Une diminution de la quantité des bactéries est observée, en général, les jours du renouvellement de l'eau et une augmentation est constatée dès le lendemain (Fig. 22). Une diminution de 25% en moyenne des *Aeromonas veronii bv sobria* est notée. Une diminution des *Citrobacter* est, également, observée mais à des quantités variables en fonction du lot (7% et 40% en moyenne en moins, pour les lots A et B testés, respectivement) (Tableau X).

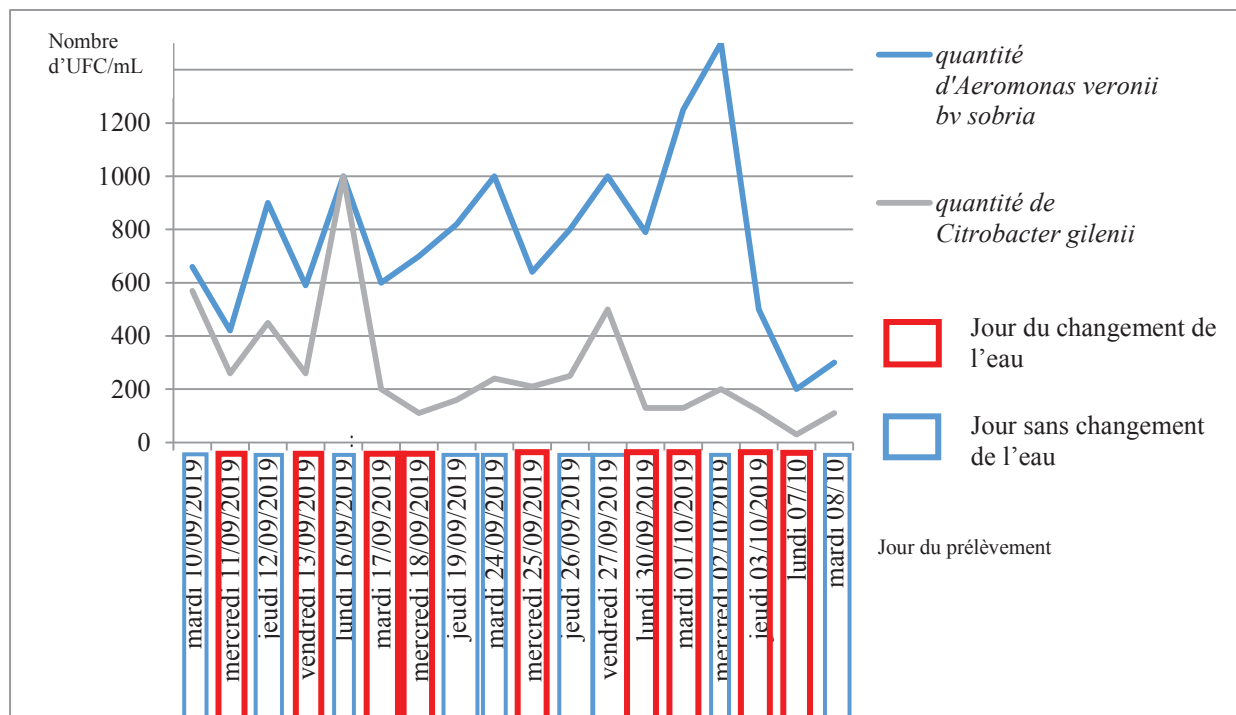


Figure 22 : Evolution du nombre de bactéries isolées en fonction de la périodicité du renouvellement de l'eau

Nom de l'espèce	<i>Aeromonas veronii bv sobria</i>		<i>Citrobacter gilenii</i>	
	Lot A	Lot B	Lot A	Lot B
<b>Moyennes du nombre de colonies avant le renouvellement de l'eau (UFC/ml)</b>	766	858	99	386,7
<b>Moyennes du nombre de colonies après le renouvellement de l'eau (UFC/ml)</b>	560	636,25	92	156,25
<b>Evolution (%)</b>	-26,9%	-25,9%	-7,6%	-40,4%

Tableau X : Moyennes du nombre de colonies d'*A. veronii bv sobria* et de *C. gilenii* avant et après le renouvellement de l'eau

Des antibiogrammes ont été réalisés sur toutes les espèces identifiées (Tableau XI).

Parmi les souches d'*Aeromonas* isolées, les *Aeromonas veronii* *bv sobria* étaient sensibles aux antibiotiques testés, alors que les 2 souches d'*Aeromonas veronii* *bv veronii* exprimaient une pénicillinase naturelle (résistance à la ticarcilline).

Les 2 souches de *Citrobacter gilenii* exprimaient une pénicillinase naturelle (résistance à l'ampicilline et la ticarcilline).

*Shewanella putrefaciens* exprimait une céphalosporinase de bas niveau (résistance à la céfalotine) associée à une résistance au cotrimoxazole.

Bactéries retrouvées	Nombre d'espèce isolée	Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	Résistance cotrimoxazole (%)	Résistance fluoroquinolones (%)
<i>C. gilenii</i>	2	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. veronii</i> <i>bv veronii</i>	2	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. veronii</i> <i>bv sobria</i>	2	Absence	0	0
<i>S. putrefaciens</i>	1	Céphalosporinase naturelle de bas niveau	100	0

Tableau XI : Phénotypes de résistance des espèces isolées dans l'eau de conservation

## **D. Proposition d'un protocole de décontamination des sangsues avant dispensation dans les services cliniques**

### **Objectif :**

Etablir un protocole de décontamination des sangsues afin de réduire la charge bactérienne présente au niveau de la flore mésophile des sangsues et par conséquent, diminuer le risque infectieux.

### **Matériels et méthodes :**

En septembre 2019, 12 sangsues de 2 lots différents (lot 19486/A et 19585/B) disponibles à la pharmacie du CHU ont été analysées. Ces 2 lots ont été réceptionnés en Août 2019.

#### 1. Etude de la flore mésophile totale des sangsues

Les sangsues ont été ramenées à température ambiante afin de retrouver leur activité normale. Chaque sangsue a été déposée à la surface soit d'une GS, ou soit d'une CPS, pendant une durée de 15 minutes (Fig. 23).

Les milieux de culture ont été incubés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.



Figure 23 : Culture d'une sangsue sur CPS

## 2. Etude de la flore mésophile après décontamination externe

Les mêmes sangsues ont subi un premier bain de 15 secondes soit de :

- Chlorhexidine 0,02% aqueuse (4 sangsues).
- Dakin® (4 sangsues).
- Les 4 dernières sangsues ont servi de témoin sans traitement et ont été rincées avec de l'eau physiologique stérile.

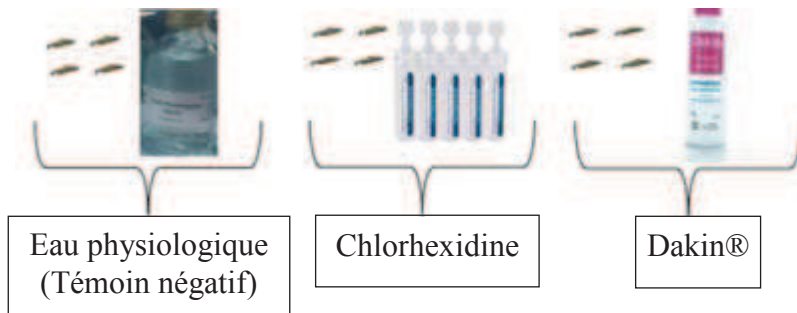
Après traitements et afin de limiter l'effet rémanent des antiseptiques, toutes les sangsues ont été placées dans un bain d'eau physiologique pendant 15 secondes.

Afin d'étudier l'effet de la décontamination, les sangsues ont été transférées sur de nouveaux milieux de culture pendant une durée de 45 minutes (Fig. 24). Les boîtes de culture ont été incubées 24- 48h à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en atmosphère aérobie.

**1- Déposer pendant 15 minutes, 12 sangsues (6 du lot A et 6 du lot B) à la surface de 6 GS et à la surface de 6 CPS**



**2- Traitement décontaminant pendant 15 secondes : 4 sangsues par traitement**



**3- Bain d'eau physiologique stérile pour chaque sangsue pendant 15 secondes**



12 pots

**4- Transférer les sangsues à la surface de nouvelles GS et CPS pendant une durée de 15 minutes pour l'étude de l'action du traitement**



**5- Transférer à la surface de nouvelles GS et CPS pendant 30 minutes pour l'étude de la durée de persistance de l'action du traitement**



Figure 24 : Protocole de décontamination externe des sangsues



## Résultats :

### 1. Flore mésophile totale des sangsues

*A. veronii biovar veronii*, *A. veronii biovar sobria*, *C. gilenii*, *Pseudomonas* spp. sont les principales bactéries identifiées sur les 2 lots de sangsues (Tableau XII).

Les mêmes bactéries ont été isolées au niveau de la flore mésophile de chacune des sangsues d'un même lot étudié. Une culture en nappe a été obtenue. *A. veronii bv sobria* était la bactérie prédominante.

Pratiquement toutes les mêmes espèces bactériennes ont été trouvées dans l'eau de conservation des sangsues. En effet, seul *C. maltaromaticum* n'est pas retrouvé dans la flore mésophile des sangsues.

Date	Lots des sangsues analysées	Bactéries retrouvées	Espèce prédominante
Septembre – Octobre 2019	19486/A	<i>A. veronii bv sobria</i> , <i>C. gilenii</i> , <i>A. veronii bv veronii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>A. veronii bv sobria</i>
	19585/B	<i>A. veronii bv sobria</i> , <i>C. gilenii</i> , <i>A. veronii bv veronii</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>S. putrefaciens</i>	<i>A. veronii bv sobria</i>

Tableau XII : Résultats bactériologiques de la flore mésophile des sangsues

Un antibiogramme a été réalisé sur chaque espèce bactérienne et les mêmes phénotypes de résistance que ceux des bactéries de l'eau de conservation ont été retrouvés (Tableau XIII).

*Aeromonas veronii bv sobria* étaient sensibles aux antibiotiques testés, alors que les 2 souches d'*Aeromonas veronii bv veronii* exprimaient une pénicillinase naturelle (résistance à la ticarcilline).

Les 2 souches de *Citrobacter gilenii* exprimaient une pénicillinase naturelle (résistance à l'ampicilline et la ticarcilline).

*Shewanella putrefaciens* exprimait une céphalosporinase de bas niveau (résistance à la céfalotine) associée à une résistance au cotrimoxazole.

Bactéries retrouvées	Nombre d'espèce isolée	Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines	Résistance cotrimoxazole (%)	Résistance fluoroquinolones (%)
<i>C. gilenii</i>	2	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. veronii</i> <i>bv veronii</i>	2	Pénicillinase naturelle de bas niveau	0	0
<i>A. veronii</i> <i>bv sobria</i>	2	Absence	0	0
<i>S. putrefaciens</i>	1	Céphalosporinase naturelle de bas niveau	100	0

Tableau XIII : Phénotypes de résistance des espèces isolées dans la flore des sangsues

## 2. Flore mésophile après la décontamination externe

Une culture positive a été obtenue dans 100% des cas après une décontamination des sangsues à l'eau physiologique (Fig. 25).

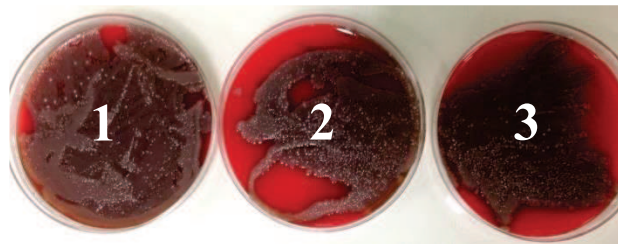


Figure 25 : Culture avant décontamination (1), après décontamination (2) et 45 minutes après décontamination (3) avec de l'eau physiologique

Une culture négative a été obtenue dans 100% des cas après une décontamination à la chlorhexidine. L'activité était encore efficace 45 minutes après le traitement décontaminant, dans 75% des cas (Fig. 26).

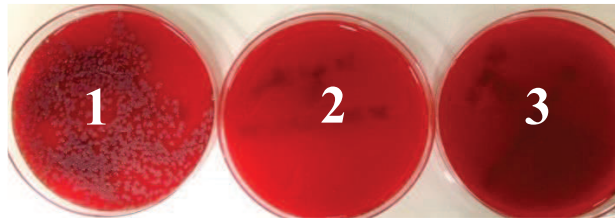


Figure 26 : Culture avant décontamination (1), après décontamination (2) et 45 minutes après décontamination (3) avec de la chlorhexidine

La décontamination des sangsues au Dakin® a été efficace dans seulement 50% des cas. La culture des sangsues a été positive dans 100% des cas, 45 minutes après le traitement décontaminant (Fig. 27).

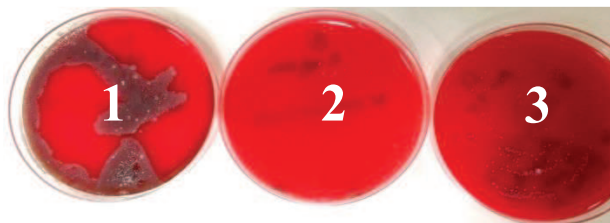


Figure 27 : Culture avant décontamination (1), après décontamination (2) et 45 minutes après décontamination (3) avec du Dakin®

## **DISCUSSION**

L'usage des sangsues est actuellement réservé aux hôpitaux, et principalement aux services de CMF, chirurgie plastique et chirurgie orthopédique. Leur indication principale est la congestion veineuse lors de la greffe de membre ou lors de la reconstruction par lambeaux (2, 77, 78).

Les sangsues sont utilisées pour améliorer le retour veineux et drainer les tissus, permettant ainsi qu'une néovascularisation veineuse se mette en place. La succion des sangsues stimule l'irrigation des tissus menacés de nécrose, favorise la restauration de l'anastomose des capillaires et accélère le processus de décongestion des hématomes et de désengorgement des greffons (2). Plusieurs études ont montré une efficacité de l'hirudothérapie de 61 à 78% (32, 78). Cependant, l'utilisation des sangsues peut être à l'origine d'effets indésirables.

Les principaux risques associés à l'hirudothérapie sont l'anémie et les infections bactériennes. Il existe un risque de contamination avéré lors de la morsure de la sangsue ou lorsque celle-ci est agressée et qu'elle régurgite du sang. L'infection à *Aeromonas* est l'effet indésirable le plus fréquent, avec comme conséquences, un risque majeur d'échec de la reconstruction par lambeaux ou la réimplantation d'un greffon.

Au CHU d'Amiens-Picardie, ces deux principaux effets indésirables ont été retrouvés dans l'étude rétrospective que nous avons menée. L'anémie a été retrouvée dans 64% des cas, 54% des patients ont nécessité une transfusion sanguine. Dans 27% des cas, une infection à *Aeromonas* a été décelée. Le taux d'échec global de l'hirudothérapie a été de 37,8%. Ce taux est passé à 80% en cas d'infection à *Aeromonas*.

Une méta-analyse décrivant 277 cas cliniques liés à l'utilisation des sangsues, a montré un taux d'infection à *Aeromonas* de 14,4% (32). Le taux d'échec global lié à l'hirudothérapie était de 22%. Ce taux passait à 62,6% en cas d'infection et les infections à *Aeromonas* représentaient 90% des cas (32).

Afin de réduire le risque infectieux, la mise en place de plusieurs mesures de bonnes pratiques d'utilisation des sangsues s'impose (bonne traçabilité, surveillance bactériologique des eaux de conservation pour une antibioprophylaxie la mieux adaptée et une décontamination préalable des sangsues avant dispensation), comme cela a déjà été décrit (77-79).

La première mesure consiste en la traçabilité des lots de sangsues qui permettra une meilleure investigation de l'origine des infections. En France, une enquête sur les pratiques

d'utilisation de l'hirudothérapie a été menée et a montré que seuls 39,1% des CHU assurent une traçabilité et un enregistrement des différents lots (79).

Au CHU d'Amiens- Picardie, suite au cas clinique à *A. hydrophila* BLSE (76), plusieurs formulaires ont été mis en place, à la pharmacie et ce, afin d'assurer une meilleure traçabilité (formulaire de délivrance, formulaire à la réception des sangsues).

La deuxième mesure consiste en un renouvellement de l'eau de conservation des sangsues qui était réalisé jusqu'en 2018, selon les recommandations de Ricarimpex®, une fois par semaine. L'enquête nationale a montré que ces recommandations n'étaient respectées que par 65,2% des CHU (79).

Depuis 2019, le fournisseur préconise un renouvellement de l'eau tous les 2 jours, en accord avec les recommandations de la FDA aux USA.

Ce travail de thèse a, en effet, montré que la charge bactérienne était moins importante les jours où un renouvellement de l'eau de conservation des sangsues a été effectué. Un renouvellement tous les 2 jours, a permis de diminuer significativement la charge bactérienne et par conséquent une diminution du risque infectieux éventuel.

La troisième mesure consiste en un contrôle bactériologique régulier de l'eau de conservation des sangsues. Cette mesure à mettre en place est importante pour la prévention du risque infectieux. En France, l'enquête réalisée a montré que seuls deux CHU sur 23 réalisent des contrôles bactériologiques de l'eau de conservation des sangsues (79). Un CHU réalise un contrôle à la réception des sangsues ou dès que l'eau est trouble. L'autre CHU réalise un contrôle mensuel (79). Au CHU d'Amiens-Picardie, à ce jour, aucune analyse bactériologique n'est réalisée.

Une analyse bactériologique régulière de l'eau serait souhaitable à chaque réception de nouveaux lots et, également, mensuellement.

Une surveillance bactériologique régulière permettra d'établir l'écologie bactérienne de l'eau de conservation des sangsues et de déterminer les phénotypes de sensibilité aux antibiotiques des bactéries présentes. Une antibioprofylaxie la plus adaptée pourra ainsi être utilisée (80, 81).

L'intérêt de l'antibioprofylaxie au cours de l'hirudothérapie a été démontré par plusieurs auteurs (81- 84), mais elle n'est utilisée de manière systématique que par 21,7% (5 sur 23) des

hôpitaux Français (79). Ceci souligne un manque d'information évident du personnel médical pour cette infection nosocomiale.

Les antibiotiques les plus fréquemment utilisés sont les fluoroquinolones, le triméthoprime / sulfaméthoxazole et les C3G (82- 85). En France, les CHU proposant une antibioprofylaxie, recommandent soit, les fluoroquinolones (2 CHU), soit, le triméthoprime / sulfaméthoxazole (2 CHU), soit, l'augmentin (1 CHU). Dans 4 CHU sur 23, ce traitement est maintenu pendant toute la durée de l'hirudothérapie (79). Ces données montrent qu'il n'existe aucune standardisation des pratiques.

Plusieurs études recommandent de débiter l'antibioprofylaxie avant ou dès l'application des sangsues. L'antibioprofylaxie doit durer aussi longtemps que l'hirudothérapie (85, 86). Certains auteurs ont suggéré de maintenir cette antibioprofylaxie jusqu'à cicatrisation (82, 86).

Un autre problème de l'hirudothérapie est, également, l'apparition de nombreux cas d'infections à *Aeromonas* résistants aux antibiotiques. En effet, depuis 2010, plusieurs auteurs ont rapporté l'émergence de souches d'*Aeromonas* résistantes, particulièrement aux fluoroquinolones et aux C3G (87- 93); antibiotiques préconisés dans l'antibioprofylaxie. L'augmentation du taux de résistance aux fluoroquinolones et aux C3G des bactéries isolées chez les sangsues peut s'expliquer par l'utilisation du sang de volaille. Le sang de bovin a été remplacé, en 2002, par le sang de volaille et ce, pour éviter le risque de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Or, en Europe, les fluoroquinolones et les C3G étaient utilisées pour la prévention du risque de colibacilloses aviaires (93, 94) ; infections bactériennes les plus fréquentes (95, 96). Les éleveurs ont été contraints d'utiliser ces antibiotiques pour limiter une perte de leur élevage (93).

Jusqu'en 2006, les antibiotiques étaient, également, utilisés par les éleveurs comme facteurs de croissance (97). En effet, l'utilisation des antibiotiques à faible dose, permettait une augmentation de la vitesse de croissance des animaux ainsi qu'une diminution de l'indice de consommation (98). L'utilisation des antibiotiques en général et des fluoroquinolones et C3G en particulier a été alors intempestive avec comme conséquence une augmentation du taux de résistance (93).

Les chiffres de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) confirment ces informations. La résistance des *E. coli* aux

fluoroquinolones, en 2010, a atteint un pic d'environ 13% chez les volailles. Le rapport Résapath 2018 (Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) a montré que les sangsues nourries avec du sang de volaille dans les années 2010, ont été largement exposées aux fluoroquinolones (99). En effet, plusieurs équipes ont rapporté des cas de résistance aux fluoroquinolones des *Aeromonas* isolés chez des sangsues depuis 2010 (87- 89, 90, 93).

L'exposition des sangsues provient également, des eaux ou des sols contaminés par les fluoroquinolones pendant la période d'élevage (100). Plusieurs études ont montré la présence de fluoroquinolones dans les eaux usées d'élevage, les eaux de rivière et le fumier (100- 102). La Ciprofloxacine résiste à la dégradation en milieu aqueux et peut rester sous forme active pendant de longues périodes (100). Une exposition, même minime est suffisante pour assurer la persistance à long terme de la résistance des *Aeromonas* à la ciprofloxacine (100).

Afin de limiter l'exposition des sangsues aux antibiotiques, un programme de surveillance des taux de fluoroquinolones dans l'environnement et chez la volaille devrait être mis en œuvre par le fournisseur.

L'évolution de la résistance aux C3G est similaire. Une augmentation du nombre de souches d'*E. coli* aviaires résistantes, a été notée dès les années 2000. Un pic de résistance aux C3G (23%) a été atteint en 2010 (94, 99). Parallèlement, depuis cette période, plusieurs équipes ont rapporté des cas d'infections à *Aeromonas* résistants aux C3G (76, 91, 92, 103, 104) et ce malgré les différents plans mis en place par les autorités (plan Ecoantibio 2012 et 2017) pour diminuer la consommation des fluoroquinolones et des C3G (105).

Afin de réduire le risque d'infection liée à l'hirudothérapie, des alternatives à l'antibioprophylaxie ont été décrites.

Certains auteurs ont préconisé de stériliser l'intestin de sangsue des agents pathogènes en les plongeant dans une solution antibiotique (tétracycline) pendant 12 heures (34).

D'autres équipes ont traité les sangsues avec du céfotaxime ou de la ciprofloxacine et ont réussi à éradiquer les bactéries du tube digestif (106- 108).

La symbiose entre sangsues et *Aeromonas* étant obligatoire pour la digestion du sang, une éradication totale des *Aeromonas*, comme le préconisent ces auteurs, n'est pourtant pas l'objectif à atteindre.

L'étude de l'équipe Montpelliéraine, publiée en 2018, indique que la décontamination externe devrait être recommandée afin d'éviter le risque infectieux (79). Cela permettrait de réduire la



présence des bactéries de la flore mésophile des sangsues, tout en gardant la symbiose obligatoire dans le tube digestif.

Actuellement, seuls 39% (9/23) des hôpitaux Français effectuent une décontamination externe à l'aide de la chlorhexidine (77,7%) ou de la gentamicine (22,3%) (79).

Au CHU d'Amiens, aucun protocole de décontamination externe des sangsues n'est utilisé.

Des modalités de décontamination des sangsues ont été décrites par plusieurs équipes, comme par exemple de plonger les sangsues dans une solution de chlorhexidine à 0,02% pendant 15 secondes, suivie de rinçages avec de l'eau stérile (77, 85).

Ce protocole a montré la meilleure efficacité dans notre travail de thèse. La chlorhexidine est, de plus, une molécule dotée d'un effet rémanent.

Les dérivés chlorés sont néfastes pour les sangsues et sont responsables de la régurgitation des bactéries et donc d'un risque infectieux accru (22). Les résultats obtenus dans notre travail confirment les données de la littérature.

Compte-tenu de nos résultats, nous préconisons une décontamination externe qui devrait être effectuée par le service prescripteur dans l'heure qui précède l'application des sangsues. Comme cela a déjà été décrit, la décontamination externe garantit un état presque exempt de bactéries pendant au moins une heure, tout en préservant les capacités de succion des sangsues (79). Une antibioprophylaxie est, également, préconisée en association (4, 79, 86, 87).

## **CONCLUSION**

Les pratiques liées aux sangsues sont multiples et variées au sein des différents CHU, en France. Elles diffèrent à tous les niveaux (conditions de conservation, fréquence du renouvellement de l'eau, contrôle bactériologique, décontamination externe, antibioprofylaxie).

L'utilisation des sangsues n'est pas totalement maîtrisée ni au CHU d'Amiens-Picardie, ni dans la majorité des autres hôpitaux, en raison d'un manque de recommandations du fournisseur.

En 2019, Ricarimpex® a actualisé ses pratiques, notamment sur la fréquence du renouvellement de l'eau de conservation, mais les recommandations restent insuffisantes. Ce manque d'informations a été à l'origine de nombreuses infections à *Aeromonas* ces dernières années.

Ce risque infectieux a une répercussion non négligeable sur le risque d'échec de la reconstruction par lambeaux ou de la réimplantation d'un membre.

Ce travail de thèse a montré que la mise en place d'une traçabilité, le contrôle bactériologique régulier de l'eau, le renouvellement 3 fois par semaine de l'eau de conservation des sangsues et la décontamination externe des sangsues avant leur application sont des pratiques de base nécessaires à la diminution du risque infectieux.

Les problèmes de santé publique liés à l'utilisation des sangsues médicinales sont peu connus par les différents acteurs de la santé.

Des lignes directrices de la Haute Autorité de Santé sont indispensables, tout comme la mise à disposition des informations sur les risques liés à l'hirudothérapie.

# **PERSPECTIVES**

Deux travaux seront effectués à la suite de cette thèse.

- Un travail sera entrepris pour déterminer l'impact des mesures mises en place sur les taux d'infections liées aux sangsues à partir de 2019 au CHU d'Amiens-Picardie.
- Une étude multicentrique rétrospective non interventionnelle sera réalisée. L'objectif principal étant de définir la prévalence nationale des infections bactériennes liées à l'hirudothérapie sur une période allant de 1 à 5 ans.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Elliott JM, Kutschera U. Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews*, 2011, vol. 4, p. 21-41.
2. Roulet L. Hirudothérapie : les sangsues n'ont pas fini de faire parler d'elles. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*, août 2010, n° 23, p. 19-21.
3. Whitaker IS, Cheung CK, Chahal CAA, Karoo ROS, Gulati A, Foo ITH. By what mechanism do leeches help to salvage ischaemic tissues? A review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, avril 2005, vol. 43, p. 155–160.
4. Herlin C, Bertheuil N, Bekaraab F, Boissiere F, Sinna R, Chaput B. Leech therapy in flap salvage: Systematic review and practical. *Annales de chirurgie plastique esthétique*, 2017, vol. 62, p. e1—e13.
5. Noel P, Lamare V. *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758. *DORIS*, 2017. Disponible sur : <https://doris.ffesmm.fr/ref/specie/4138>
6. Guibourt NJ-BG. Histoire naturelle des drogues simples. 1831, quatrième tome, p. 249-257. Disponible sur : [https://books.google.fr/books/about/Histoire\\_naturelle\\_des\\_drogues\\_simples.html](https://books.google.fr/books/about/Histoire_naturelle_des_drogues_simples.html)
7. Ricarimpex. Sangsues médicinales. Disponible sur : <http://sangsue-medicinale.com/>
8. Schwab IR. A backseat driver. *British Journal of Ophthalmology*, décembre 2006, vol. 90(12), p. 1447.
9. Ali MA. A Photoreception and vision in invertebrates. *NATO ASI Series*, 1984, vol. 74, p. 318-319.

10. Maltz MA, Bomar L, Lapierre P, Morrison HG, McClure EA, Sogin ML and Graf J. Metagenomic analysis of the medicinal leech gut microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2014, vol. 5, p. 151.
11. Sawyer RT. Leech biology and behavior Feeding: volume II: Biology, Ecology and Systematics. Feeding and digestive system. *Oxford science publications*, 1986, vol. II, p. 467. Disponible sur : <http://www.biopharm-leeches.com/uploads/1/2/6/2/12624111/bioandbehav.pdf>
12. Desiles E. Des sangsues et des hommes. *Astrado provençalo*, 2016, p. 54-76. Disponible sur : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01310130>
13. Duval C. *Hirudo medicinalis* : de sa physiologie à l'hirudothérapie. 82 pp. Thèse : Pharmacie : Rouen : 2013. Disponible sur : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00831872/document>
14. Abdulkader AM, Ghawi AM, Alaama M, Awang M, Merzouk A. Leech therapeutic applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, vol. 75, p. 127–137.
15. Lent CM, Dickinson MH. On the termination of ingestive behavior by the medicinal leech. *The Journal of Experimental Biology*, 1987, vol. 131, p. 1-15.
16. BIEBERTALER LEECH BREEDING FARM. Legal status of Medirud RBiebertal (medicinal leeches) as Drug / Medicinal Product. Disponible sur : [http://www.blutegel.de/egel/opencms/en/aktuelles\\_en/news/news\\_0008.html](http://www.blutegel.de/egel/opencms/en/aktuelles_en/news/news_0008.html)
17. Venglarcik P. Nursing service guidelines. *Leeches U.S.A.*, juillet 2017. Disponible sur : [https://www.utoledo.edu/policies/utmc/nursing/guidelines/general/pdfs/leech\\_therapy\\_guidelines.pdf](https://www.utoledo.edu/policies/utmc/nursing/guidelines/general/pdfs/leech_therapy_guidelines.pdf)
18. Khatun S. Use of leeches in Plastic and reconstructive surgery. *United kingdom Biopharm Leeches*, mai 2019. Disponible sur : <http://www.biopharm-leeches.com>

19. Bennett-Marsden M, Annie Ng. Hirudotherapy: a guide to using leeches to drain blood from tissue. *Clinical Pharmacist*, avril 2014, vol. 6, n° 3, p. 69.
20. Chenu C. L'hirudothérapie en médecine et en chirurgie modernes. 145 pp. Thèse : Vétérinaire : Lyon : 2012. Disponible sur : [http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjix\\_C2-KvrAhUqy4UKHUioDb0QFjAAegQIAxAB&url=http%3A%2F%2Fwww2.vetagro-sup.fr%2Fbib%2Ffondoc%2Fth\\_sout%2Fdl.php%3Ffile%3D2012lyon086.pdf&usg=AOvVaw1OR9Py-LpcViQL3AI0hY2n](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjix_C2-KvrAhUqy4UKHUioDb0QFjAAegQIAxAB&url=http%3A%2F%2Fwww2.vetagro-sup.fr%2Fbib%2Ffondoc%2Fth_sout%2Fdl.php%3Ffile%3D2012lyon086.pdf&usg=AOvVaw1OR9Py-LpcViQL3AI0hY2n)
21. Mumcuoglu KY. Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, février 2014, vol. 2014, p. 1-7.
22. Abdullah S, Scholar Mvs, Parasitology D, Gbpuat G, Pantnagar P, Uttarakhand U, *et al.* Hirudotherapy Leech therapy: Applications and Indications in Surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 2012, vol. 1, p. 172-180.
23. Lui C and Barkley TW Jr. Medicinal leech therapy : New life for an ancient treatment. *Nursing 2015*, 2015, vol. 45, p. 25-30.
24. Riot S. Prise en charge de la souffrance veineuse aigue des lambeaux : état des lieux. 131 pp. Thèse : Médecine : Toulouse : 2017. Disponible sur : <http://thesesante.ups-tlse.fr/1857/1/2017TOU31529.pdf>
25. Brzezinski P, Solovan C, Chiriac A, Foia L. Case Report: Positive outcome of medical leeches (hirudotherapy) for venous congestion. *Malawi Medical Journal*, 2015, vol. 27, p. 38-39.
26. Ghods R, Abdi M, Pourrahimi M, Hashem Dabaghian F. Leech therapy indications: a scoping review. *Traditional Medicine Research*, mai 2019, vol. 4, p. 118-130.



27. Stangea R, Mosera C, Hopfenmuellerb W, Mansmannc U, Buehringa M, Uehlekea B. Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee. *Complementary Therapies in Medicine*, 2012, vol. 20, p. 1-7.
28. Hildebrandt J-P, Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturewissenschaften*, 2011, vol. 98, p. 995-1008.
29. Horellou M-H, Flaujac C, Gouin Thibault I. Hémostase : physiologie et principaux tests d'exploration. *EMC - AKOS Traité de Médecine*, 2012, vol. 7(2), p. 1-4.
30. Sig AK, Guney M, Uskudar Guclu A, Ozmen E. Medicinal leech therapy-an overall perspective. *Integrative Medicine Research*, décembre 2017, vol. 6(4), p. 337-343.
31. Zaidi SMA, Jameel SS, Zaman F, Jilani S, Sultana A, Khan SA. A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, mars 2011, vol. 16(1), p. 59-65.
32. Whitaker IS, Oboumarzouk O, Rozen WM *et al.* The efficacy of medicinal leeches in plastic and reconstructive surgery: a systematic review of 277 reported clinical cases. *Microsurgery*, 2012, vol. 32, p. 240-250.
33. Bourdais L, Heusse J-L, Aillet S, Schoentgen C, Watier E. Leech-borne infection on a TRAM flap: a case report. *Annales de chirurgie plastique et esthétique*, 2010, vol. 55, p. 71-73.
34. Sartor C, Limouzin-Perotti F, Legré R, Casanova D, Bongrand M-C, Sambuc R, *et al.* Nosocomial Infections with *Aeromonas hydrophila* from Leeches. *Clinical Infectious Disease*, 2002, vol. 35, p. e1-e5.
35. Pereira JA, Greig JR, Liddy H, Ion L and Moss ALH. Leech-borne *Serratia marcescens* infection following complex hand injury. *British Journal of Plastic Surgery*, 1998, vol. 51, p. 640-649.

36. Whitaker IS, Maltz M, Siddall ME, Graf J. Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo Orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2014, vol. 133(3), p. 408e–418e.
37. Nonomura H, Kato N, Ohno Y, Itokazu M, Matsunaga T, Watanabe K. Indigenous bacterial flora of medicinal leeches and their susceptibilities to 15 antimicrobial agents. *Journal of Medical Microbiology*, 1996, vol. 45(6), p. 490-493.
38. Eroglu C, Hokelek M, Guneren E, Esen S, Pekbay A, Uysal OA. Bacterial flora of *Hirudo medicinalis* and their antibiotic sensitivities in the Middle Black Sea Region, Turkey. *Annals of plastic surgery*, 2001, vol. 47, p. 70-73.
39. Baranovsky S, Talagrand-Reboul E, Villiet M, Renaudin P, Berchi M, Grau D, Morquin D, Romano-Bertrand S et Jumas-Bilak E. Résistance des souches bactériennes colonisant les sangsues d'usage médical. *Congrès national de la société française hospitalière*, 2018.
40. Levine SM, Frangos SG, Hanna B, Colen K, and Levine JP. *Aeromonas* Septicemia After Medicinal Leech Use Following Replantation of Severed Digits. *American Journal of Critical Care*, septembre 2010, vol. 19, p. 469-471.
41. Nicolau MH, Darbas H, Rousseny-jean A et Jean-Pierre H. A propos d'un nouveau cas de suppuration cutanée à *Aeromonas hydrophila* après pose de sangsues. Intérêt de leur décontamination. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1989, vol. 19, p. 196-197.
42. Sun J, Tian X, Fang W, Huang J, Zhang T, Ding J. Post-traumatic necrotizing fasciitis and sepsis shock caused by *Aeromonas hydrophila*: a case report and summary of related reports. *Biomedical Research 2017*, 2017, vol. 28, p. 9885-9889.
43. Bomar L, Maltz M, Colston S, and Graf J. Directed Culturing of Microorganisms Using Metatranscriptomics. *MBio*, 2011, vol. 2(2), p. e00012-11.
44. Nelson MC, Graf J. Bacterial symbioses of the medicinal leech *Hirudo verbena*. *Gut Microbes*, 2012, vol. 3, p. 322–333.

45. Sawyer RT. Leech biology and behavior: volume II: Feeding, Biology, Ecology and Systematics. Endosymbiosis. *Oxford science publications*, 1986, vol. II, p. 514.
46. Sawyer RT. Leech biology and behavior: volume II: Feeding, Biology, Ecology and Systematics. Digestive physiology. *Oxford science publications*, 1986, vol. II, p. 518.
47. Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganism*, 2020, vol. 8, p. 129.
48. Lowry R, Balboa S, Parker JL, Shaw JG. Chapter Five - *Aeromonas* Flagella and Colonisation Mechanisms. *Advances in Microbial Physiology*, 2014, vol. 65, p. 203-256.
49. Janda JM and Abbott SL. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical microbiology review*, 2010, vol. 23, p. 35–73.
50. Harf-Monteil C et Monteil H. *Aeromonas*. Précis de la bactériologie clinique. *ESKA*, mars 2008, vol. 2, Section VIII, chapitre 10, p. 1-10.
51. Lamy B. *Aeromonas* et aéromonoses en médecine humaine. *EMC - Biologie médicale*, 2012, vol. 0(0), p. 1-7.
52. Lamy B, Kodjo A, Laurent F. Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. *Journal Clinical Microbiology*, 2009, vol. 47, p. 1234-1237.
53. Collège National des Enseignants de Dermatologie. Infections cutanéomuqueuses Bactériennes. *Université Médicale Virtuelle Francophone*, 2010-2011. Disponible sur : [http://campus.cerimes.fr/dermatologie/enseignement/dermato\\_9/site/html/cours.pdf](http://campus.cerimes.fr/dermatologie/enseignement/dermato_9/site/html/cours.pdf)
54. Tomas JM. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. *International Scholarly Research Notices Microbiology*, 2012, vol. 2012, 22 pp.
55. Batra P, Mathur P, and Misra MC. *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of Laboratory Physicians*, 2016, vol. 8(1), p. 1–4.

56. Rasmussen-Ivey CR, Figueras MJ, McGarey D and Liles MR. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7, p. 1337.
57. Talagrand E. Diversité, complexité et adaptation au comportement pathogène au sein du genre *Aeromonas*. 299 pp. Thèse : Médecine : Montpellier : 2017. Disponible sur : [https://ged.biu-montpellier.fr/florabium/jsp/win\\_main\\_biu.jsp?nnt=2017MONTT123&success=%2Fjsp%2Fwin\\_main\\_biu.jsp&profile=anonymous](https://ged.biu-montpellier.fr/florabium/jsp/win_main_biu.jsp?nnt=2017MONTT123&success=%2Fjsp%2Fwin_main_biu.jsp&profile=anonymous)
58. Kirov SM, Tassel BC, Semmler ABT, O'Donovan LA, Rabaan AA et Shaw JG. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of Bacteriology*, 2002, vol. 184, p. 547-555.
59. Ruhai R, Antti H, Rzhapishevska O, Boulanger N, Barbero DR, Wai SN, *et al.* A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, vol. 127, p. 182-191.
60. Sierra JC, Suarez G, Sha J, Baze WB, Foltz SM, and Chopra AK. Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector AexU from *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 2010, vol. 49, p. 122–134.
61. Tremblay YDN, Hathroubi S, et Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2014, vol. 78, p. 110-116.
62. Talagrand-Reboul E, Jumas-Bilak E and Lamy B. The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and Quorum Sensing Systems. *Frontiers in microbiology*, 2017, vol. 8, article 37.
63. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, vol. 2(11): a012427, p. 1-25.

64. Sciensano. Microbiologie, rapport global définitif, Mauditof 2019. *Sciensano Bruxelles 2020*, 02/01/2020, FORM 43/124/F V13, p. 16. Disponible sur : [https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external\\_quality/rapports/\\_down/microbiologie/2019/Mauditof-FR-2019.pdf](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/rapports/_down/microbiologie/2019/Mauditof-FR-2019.pdf)
65. Lamy B, Kodjo A, Laurent F, ColBVH Study Group. Identification of *Aeromonas* Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 2011, vol. 71(1), p. 1-5.
66. Dey Bhowmick U and Bhattacharjee S. Bacteriological, Clinical and Virulence Aspects of *Aeromonas*-associated Diseases in Humans. *Polish Journal of Microbiology*, 2018, vol. 67(2), p. 137–149.
67. Fraisse T, Lechiche C, Sotto A, Lavigne J-P. Infections à *Aeromonas* spp. : étude rétrospective de 1997 à 2004 au CHU de Nîmes. *Pathologie Biologie*, 2008, vol. 56, p. 70–76.
68. Chen P-L, Ko W-C, Wu C-J. Complexity of  $\beta$ -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2012, vol. 45(6), p. 398–403.
69. Fosse T, Giraud-Morin C, Madinier I. Phenotypes of beta-lactam resistance in the genus *Aeromonas*. *Pathologie Biologie (Paris)*, 2003, vol. 51, p. 290-296.
70. Wu CJ, Chuang YC, Lee MF, Lee CC, Lee HC, Lee NY, *et al.* Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Aeromonas* spp. at a medical center in southern Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, vol. 55, p. 5813-5818.
71. Bulletin d'information du CAPP-INFO. Désinfectants et antiseptiques. *Hôpitaux universitaires de Genève*, juin 2007, n° 46. Disponible sur : <https://pharmacie.hug.ch/sites/pharmacie/files/infomedic/cappinfo/cappinfo46.pdf>
72. Yildirim A, Metzler P, Lübbers H-T, Yildirim V. Digluconate de chlorhexidine – histoire, mécanisme d'action et risques. *Swiss Dental Journal SSO*, 2015, vol. 125, p. 830-831.

73. Gautier C. Le bon usage des antiseptiques pour la prévention du risque infectieux chez l'adulte. *CCLIN (Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales) Sud-Ouest*, édition 2013. Disponible sur : [http://www.cclin.arlin.fr/nosobase/recommandations/cclin\\_arlin/cclinSudOuest/2013\\_Antiseptiques\\_CCLIN.pdf](http://www.cclin.arlin.fr/nosobase/recommandations/cclin_arlin/cclinSudOuest/2013_Antiseptiques_CCLIN.pdf)
74. Beclin E. Utilisation des antiseptiques en EMS. *Centre Hospitalier de Béthune*, mai 2016. Disponible sur : <http://www.cpias-ile-defrance.fr/REGION/NPC/EMS190516/Antiseptiques.pdf>
75. STFG (Société de Formation Thérapeutique du Généraliste). Hygiène et prévention du risque infectieux en cabinet médical ou paramédical. *STFG - HAS (Service des recommandations professionnelles)*, juin 2007. Disponible sur : [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/hygiene\\_au\\_cabinet\\_medical\\_-\\_argumentaire.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/hygiene_au_cabinet_medical_-_argumentaire.pdf)
76. Floug Q, Sinna R, Fillatre A, Plesiat P, Hamdad F. A case of leech-associated infection involving an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and extensively drug-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, vol. 25, p. 394-395.
77. Perrier Q, Parmentier R, Bros A, Pavese P, *et al.* Réflexion pluri-professionnelle pour la promotion du bon usage des sangsues en établissement de santé. *Le pharmacien hospitalier et clinicien*, 2018, vol. 53, p. 1-5.
78. Cornejo A, Shamma RL, Poveromo LP, Lee HJ, Hollenbec STk. Institutional Outcomes of Leech Therapy for Venous Congestion in 87 Patients. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 2017, vol. 33(09), p. 612-618.
79. Grau D, Masson R, Villiet M, Lamy B, and French Hospitals Group. Leech management before application on patient: a nationwide survey of practices in French university hospitals. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2018, vol. 19, p. 7.
80. Wilmer A, Slater K, Yip J, Carr N, Grant J. The role of leech water sampling in choice of prophylactic antibiotics in medical leech therapy. *Microsurgery*, 2013, vol. 33(4), p. 301–304.

81. Verriere B, Sabatier B, Carbonnelle E, Mainardi JL, Prognon P, Whitaker I, *et al.* Medicinal leech therapy and *Aeromonas* spp. infection. *The European Journal of Clinical Microbiology and infectious disease*, 2016, vol. 35(6), p. 1001–1006.
82. Lineaweaver WC, Hill MK, Buncke GM, Follansbee S, Buncke HJ, Wong RK, *et al.* *Aeromonas hydrophila* infections following use of medicinal leeches in replantation and flap surgery. *Annals of Plastic Surgery*, 1992, vol. 29(3), p. 238–244.
83. Kruer RM, Barton CA, Roberti G, Gilbert B, McMillian WD. Antimicrobial Prophylaxis during *Hirudo medicinalis* Therapy: A Multicenter Study. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 2015, vol. 31(3), p. 205-209.
84. Whitaker IS, Josty IC, Hawkins S, Azzopardi E, Naderi N, Graf J, *et al.* Medicinal leeches and the microsurgeon: a four-year study, clinical series and risk benefit review. *Microsurgery*, 2011, vol. 31(4), p. 281–287.
85. Bauters TGM, Buyle FMA, Verschraegen G, Vermis K, Vogelaers D, Claeys G, *et al.* Infection risk related to the use of medicinal leeches. *Pharmacy World and Science PWS*, 2007, vol. 29 (3), p. 122–125.
86. Whitaker IS, Izadi D, Oliver DW, Monteath G, Butler PE. *Hirudo Medicinalis* and the plastic surgeon. *British Journal of Plastic Surgery*, 2004, vol. 57(4), p. 348–353.
87. Giltner CL, Bobenchik AM, Uslan DZ, Deville JG, Humphries RM. Ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila* cellulitis following leech therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, vol. 51(4), p. 1324–1326.
88. Van Alphen NA, Gonzalez A, McKenna MC, McKenna TK, Carlsen BT, Moran SL. Ciprofloxacin-resistant *Aeromonas* infection following leech therapy for digit replantation: report of 2 cases. *Journal of Hand Surgery*, 2014, vol. 39(3), p. 499–502.
89. Patel KM, Svestka M, Sinkin J, Ruff P. Ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila* infection following leech therapy: a case report and review of the literature. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery JPRAS*, 2013, vol. 66(1), p. e20–e22.

90. Wang EW, Warren DK, Ferris VM, Casabar E, Nussenbaum B. Leech-transmitted ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 2011, vol. 137(2), p. 190-193.
91. Bykowski MR, Zhu X, Diaz-Garcia R. Ceftriaxone-Resistant *Aeromonas hydrophila* Infection Following Leech Therapy: A New Resistant Strain. *Annals of Plastic Surgery*, 2018, vol. 81(3), p. 327-328.
92. Ruppé E, Cherkaoui A, Wagner N, La Scala GC, Beaulieu J-Y, Girard M, Frey J, Lazarevic V and Schrenzel J. In vivo selection of a multidrug resistant *Aeromonas salmonicida* during medicinal leech therapy. *New Microbes and New Infections*, janvier 2018, vol. 21, p. 23–27.
93. Sartor C, Bornet C, Guinard D, Fournier P-E. Transmission of *Aeromonas hydrophila* by leeches. *Lancet 2013*, 2013, vol. 381, p. 1686.
94. Kempf I et Baron S. Les bactéries *E. coli* résistantes aux C3G chez les poussins, la résistance des souches d'*Escherichia coli* après l'administration de ceftiofur à des poussins *Gallus gallus*. *Les Cahiers de la Recherche n° 10 - Santé, Environnement, Travail, ANSES*, octobre 2017, p. 42-43.
95. Robineau B, Moalic P-Y. Une maladie d'actualité en production aviaire : la colibacillose. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*, 2010, tome 163, n° 3, p. 207-212.
96. Stordeur P, Mainil J. La colibacillose aviaire. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 2002, vol. 146, p. 11-18.
97. Conseil Scientifique Union Européenne. Interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux. 2005. Disponible sur : [http://europa.eu.int/comm/health/ph/others/antimicrob\\_resist/am\\_02\\_fr.pdf](http://europa.eu.int/comm/health/ph/others/antimicrob_resist/am_02_fr.pdf)
98. Corpet DE. Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2000, vol. 151, p. 99-104.



99. ANSES 2019. Résapath - Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2018. *ANSES éditions*, novembre 2019, 161 pp. Disponible sur : [https://resapath.anses.fr/resapath\\_uploadfiles/files/Documents/Rapport%20annuel/2018\\_RES\\_APATH%20Rapport%20Annuel.pdf](https://resapath.anses.fr/resapath_uploadfiles/files/Documents/Rapport%20annuel/2018_RES_APATH%20Rapport%20Annuel.pdf)
100. Beka L, Fullmer MS, Colston SM, Nelson MC, Talagrand-Reboul E, Walker P, Ford B, Whitaker IS, Lamy B, Gogarten JP, and Graf J. Low-Level Antimicrobials in the Medicinal Leech Select for Resistant Pathogens That Spread to Patients. *MBio*, 2018, vol. 9, p. e01328-18.
101. Wei R, Ge F, Chen M, Wang R. Occurrence of ciprofloxacin, enrofloxacin, and florfenicol in animal wastewater and water resources. *Journal of Environmental Quality*, 2012, vol. 41, p. 1481–1486.
102. Moraru R, Pourcher AM, Jadas-Hecart A, Kempf I, Ziebal C, Kervarrec M, Comunal PY, Mares M, Dabert P. Changes in concentrations of fluoroquinolones and of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae in chicken feces and manure stored in a heap. *Journal of Environmental Quality*, 2012, vol. 41, p. 754 –763.
103. Barraud O, Robert A, Laval L, Ruimy R, Morquin D, Boyer L, Lamy B. It takes two to tango: two *Aeromonas* isolates combine virulence and multidrug resistance in flap infection following leech therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, juin 2020, vol. 26(6), p. 793-794.
104. Mokhtar K, Culnan DM, Lineaweaver WC. Evolving Antibiotic Resistance of *Aeromonas* species in Finger Replantation. *Surgical Infections (Larchmt)*, mars 2020, vol. 21 (2), p. 158-160.
105. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. ECOANTIBIO2 : plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire 2017-2021. Mai 2017. Disponible sur : [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/170419\\_plan\\_ecoantibio2.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/170419_plan_ecoantibio2.pdf)

106. Mackay DR, Manders EK, Saggars GC, Banducci DR, Prinsloo J, Klugman K. *Aeromonas* species isolated from medicinal leeches. *Annals of Plastic Surgery*, 1999, vol. 42(3), p. 275–279.
107. Golden MA, Quinn JJ, Partington MT. Leech therapy in digital replantation. *AORN Journal*, 1995, vol. 62, p. 364–375.
108. Litwinowicz A and Blaszkowska J. Preventing Infective Complications following Leech Therapy: Elimination of Symbiotic *Aeromonas* spp. from the Intestine of *Hirudo verbana* Using Antibiotic Feeding. *Surgical infections*, 2014, vol. 15, n° 6.

# ANNEXES

# Annexe 1 :

<p><b>Sangues médicinales : Hirudo medicinalis</b></p> <p><b>Mode d'action :</b> morsure et succion assurant la ponction de sang et la libération de substances dans le système sanguin et tissulaire.</p> <p><b>Présentation du produit :</b> Animal vivant de 1 à 2 g pour application intradermique de 30 à 60 minutes.</p> <p>Veillez lire attentivement l'intégralité de cette notice avant d'utiliser ce médicament. Il est important de conserver cette notice car vous pourriez avoir besoin de la relire.</p> <p>Si vous avez d'autres questions ou besoin de conseils, vous pouvez demander plus d'informations à votre médecin ou votre pharmacien.</p> <p>En cas d'effets secondaires inhabituels dans leur forme ou leur intensité, vous devez les signaler immédiatement à votre médecin. De même, si vous remarquez des effets indésirables non mentionnés dans cette notice, veuillez en informer votre médecin ou votre pharmacien.</p> <p>Pour garantir la sécurité du produit, il est important de respecter les conseils de conservation et d'utilisation indiqués.</p>	<p>Le nombre de sangsues à appliquer dépend de l'indication. A titre indicatif, une à deux sangsues par pose sont appliquées pour traiter un oedème réimplanté, les poses sont alors répétées à intervalle de temps régulier. Il est toutefois déconseillé d'appliquer plus de 10 sangsues en une pose.</p> <p><b>Mesures préventives à l'usage des sangsues</b></p> <p>Les sangsues utilisées doivent être en « bon état » : pas de signes de blessures ou de contractions du corps, pas de plaies, de pustules, de bouche déformée ou de présence de traces de sang. Les produits présentant ces défauts doivent être éliminés.</p> <p>Il est nécessaire d'assurer un rinçage très régulier des sangsues : changement complet de l'eau de stockage tous les 2 jours.</p> <p>Les sangsues doivent impérativement être rincées dans de l'eau minérale à 2 reprises avant leur utilisation.</p> <p>La nécessité de mise en place d'une antibiothérapie adaptée, est décidée par le praticien. Elle est fortement recommandée en particulier sur les patients présentant une immunodéficience (liste d'antibiotiques ci-jointe).</p> <p><b>Protocole d'application</b></p> <p>La tête de la sangsue est reconnaissable par ses mouvements permanents de recherche, partie la plus fine, alors que la partie postérieure, présentant la grosse ventouse, n'est utilisée que pour la fixation.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1- Nettoyer soigneusement la peau du patient à l'aide de savon neutre et d'eau puis rincer les zones nettoyées.</li><li>2- Différentes méthodes peuvent être préconisées pour l'application : Le port de gants est recommandé pour la manipulation des sangsues. Afin de ne pas blesser les animaux, l'usage de pinces à bouts ronds est également préconisé. Méthode 1 : positionner la sangsue dans un tube (par exemple tube d'une seringue en plastique) et renverser la face ouverte du tube contre la peau. Une fois la sangsue fixée, retirer le tube. Méthode 2 : Placer une compresse perforée afin de laisser la zone à traiter accessible puis positionner et maintenir la tête de la sangsue dans la zone, jusqu'à ce que la sangsue soit fixée.</li><li>3- La sangsue se fixe généralement rapidement. Cependant, si elle refuse de mordre, il est possible de piquer légèrement la zone avec une aiguille pour faire perler un peu de sang afin d'inciter la sangsue à mordre. Sinon, utiliser une autre sangsue.</li></ol>	<p>Une réticence persistante d'une sangsue à mordre peut signifier un apport pauvre en sang artériel au niveau des tissus à traiter ou des conditions de stress pour l'animal.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>4- Une fois fixée, la sangsue recse généralement en place jusqu'à la fin de son repas. Pour rassurer le patient contre un éventuel déplacement durant la pose, il est possible de faire un pansement très lâche au-dessus de la sangsue lorsque celle-ci est fixée pour éviter tout risque de fuite et masquer l'animal de la vue du patient. Il est important de ne pas comprimer la sangsue. Une surveillance régulière de l'équipe médicale durant la pose est conseillée, en particulier lors d'application à proximité d'orifices.<p>La pose dure 30 à 45 minutes : il est indispensable d'attendre que la sangsue se détache naturellement. En effet, les retraits forcés peuvent conduire à la régurgitation de la sangsue au site de la morsure et augmenter les risques de contamination par les bactéries présentes dans le tractus digestif.</p><ol style="list-style-type: none"><li>5- Les sangsues sont à usage unique. Une fois utilisées, les sangsues doivent être détruites : placer les dans un bain d'eau de javel concentrée afin de les tuer rapidement. La filière d'élimination est celle des Déchets d'Activités de Soins à Risque Infectieux (DASRI) ou des déchets ménagers.</li><li>6- Le saignement engendré par la pose de sangsue peut durer de 6 à 24h, le volume sanguin perdu est estimé à 30 à 50 ml par sangsue. Durant cette phase, il est nécessaire de mettre en place un bandage adapté au flux sanguin (le bandage compressif est déconseillé).</li><li>7- Il est important de surveiller les sites de morsure jusqu'à la cicatrisation complète. Le praticien doit en effet s'assurer quotidiennement de l'absence d'infection au niveau des plaies.</li><li>8- Afin d'éviter une infection des plaies, souvent due aux démangeoisons et aux grattages au site de la pose par le patient, un pansement renouvelé quotidiennement peut être mise en place. Si nécessaire, la prescription de traitements pour soulager les démangeoisons ou l'inflammation locale peut-être mise en place par le praticien.</li></ol></li></ol>
<p><b>Indications thérapeutiques</b></p> <p>Les sangsues sont indiquées en microchirurgie et en chirurgie plastique dès qu'il y a constat d'une stase ou congestion veineuse : réimplantation de doigts, d'oreilles, de membres, autogreffe de cuir chevelu, reconstructions mammaires, transplantations tissulaires... Elles sont également préconisées dans les états congestifs traumatiques : hématomes, suites opératoires.</p> <p><b>Mode d'action</b></p> <p>Par leur effet de succion, les sangsues stimulent l'irrigation des cellules menacées de nécrose en maintenant l'oxygénation du tissu. Elles favorisent aussi la restauration de l'anastomose des capillaires et accélèrent le processus de décongestion des hématomes et le désengorgement des greffons. En assurant le drainage et en remplaçant le retour veineux partiellement ou totalement, elles permettent qu'une néo vascularisation veineuse se mette en place.</p> <p><b>Durée du traitement et quantité</b></p> <p>La fréquence et la durée du traitement par les sangsues sont fixées par le praticien. Toutefois à titre indicatif, en pratique chirurgicale, le traitement dure généralement entre 3 et 7 jours, durée permettant généralement qu'une restauration du système veineux soit constatée.</p>	<p><b>Contre-indications</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Troubles de la coagulation sang uine (hémophilie)</li><li>- Traitement concomitant avec des substances anticoagulantes</li><li>- Anémie</li><li>- Gastrites érosives, saignements gastro-intestinaux ou ulcères de l'estomac présentant des saignements</li><li>- Tendance aux saignements</li></ul>	

- Maladies infectieuses à un stade aigu ou avec fièvre
- Traitement concomitant avec des immunosuppresseurs ou personnes immunodéficientes
- Diathèse allergique, allergie connue à une des substances de la salive de sangsue
- Déficit de cicatrisation, chéloïdes

Par précaution, la pose de sangsues n'est pas recommandée chez les femmes enceintes et allaitantes.

### Effets indésirables

#### Les plus fréquents :

- Sensations désagréables ou douleurs localisées au point de pose
- Démangeaisons localisées dans les heures ou les jours qui suivent la pose
- Gonflement des ganglions lymphatiques
- Coloration rouge-violacée de la morsure

#### Fréquents :

- Inflammation locale avec un gonflement au point de morsure souvent accompagnés de démangeaisons
- Symptômes allergiques locaux
- Gonflement en périphérie du point de morsure pouvant durer plusieurs jours
- Saignement prolongé au niveau de la plaie

#### Rares :

- Infection primaire à *Aeromonas hydrophila*, symbiote de la sangsue ou infection secondaire due à la pénétration de pathogènes au niveau de la plaie

### Conservation des sangsues

- Déballer les sangsues dès leur réception. Conserver la documentation fournie : notice, bon de livraison et numéro de lot fourni par Ricarimpex permettant d'assurer la traçabilité du produit vendu.
- Utiliser un bocal en verre ou en plastique alimentaire stérile ou à défaut désinfecté à chaque nouvelle réception de lot. Les contenants doivent être rincés pour éliminer toutes traces de résidus de produits de nettoyage. Il est nécessaire de fermer chaque contenant avec un couvercle étanche ou de le couvrir à

l'aide d'un tissu de coton, fermement maintenu par des élastiques. Ne jamais faire de perforations dans le couvercle, les sangsues pourraient s'échapper.

Utiliser uniquement de l'eau minérale ou de l'eau de source.

Changer l'eau tous les 2 jours en évitant les chocs thermiques. En cas de constat de mortalité, retirer aussitôt les sangsues mortes et intensifier les changements d'eau les jours suivants (1 fois par jour). Une fiche de traçabilité pour la mise en place des changements d'eau est proposée à la demande par Ricarimpex (fiche au format pdf transmise par E-mail).

Conserver idéalement les sangsues à une température comprise entre 4 et 20°C, une température basse favorise une longue conservation. Même si l'obscurité n'est pas nécessaire, éviter la lumière intense et l'exposition au soleil. La conservation au réfrigérateur nécessite une remise à température ambiante avant usage pour une reprise de vigueur des animaux. Dans ces conditions, les sangsues peuvent être conservées pendant plusieurs semaines.

Ne jamais mélanger différents lots de sangsues.

Ne jamais relâcher de sangsues dans la nature même non utilisées.

A noter : Les sangsues sont sensibles aux facteurs environnants : odeurs fortes, conditions orageuses, lumières artificielles intenses... qui peuvent modifier leur comportement. L'agitation des sangsues est souvent signe d'inconfort.

Pour toute question ou problème de conservation, contacter les services de Ricarimpex (E-mail, téléphone du lundi au vendredi de 9H à 17H).



**RICARIMPEX SAS**

**Sangsues médicinales**



245 Avenue de Saint Médard  
33320 Eysines  
Tél : 05 56 57 84 12  
Fax : 05 56 57 84 14  
E-mail : ricarimpex@sangsue-medicinale.com  
Site internet : www.sangsue-medicinale.com





Contents lists available at ScienceDirect

## Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)

## Letter to the Editor

## A case of leech-associated infection involving an extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing and extensively drug-resistant *Aeromonas hydrophila*

Q. Floug<sup>1</sup>, R. Sinna<sup>2</sup>, A. Fillatre<sup>3</sup>, P. Plésiat<sup>4</sup>, F. Hamdad<sup>1,\*</sup><sup>1</sup> Department of Clinical Bacteriology, Amiens-Picardie University Hospital, France<sup>2</sup> Department of Plastic Surgery, Amiens-Picardie University Hospital, France<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Amiens-Picardie University Hospital, France<sup>4</sup> Department of Clinical Bacteriology, University Hospital Beauvais, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 October 2018

Received in revised form

26 October 2018

Accepted 3 November 2018

Available online 22 November 2018

Editor: L. Leibovici

## To the Editor

Venous congestion in transplanted or reimplanted tissues remains a common and challenging complication in reconstructive surgery. Medicinal leeches have consequently been increasingly used for salvage of compromised pedicle flaps and microvascular free-tissue transfers [1]. Local application of leeches is effective to reduce postoperative venous congestion of the flap and to restore normal blood flow. After being used for many years, *Hirudo medicinalis* received official FDA approval as a medical device in 2004.

However, leech therapy is associated with a number of risks, including significant blood loss requiring transfusion and infections. Leeches maintain a symbiotic relationship with *Aeromonas* species in order to digest blood in their gut. These bacteria appear to be the commonest cause of leech-associated infection, which, in some cases, can result in extensive soft tissue destruction and myonecrosis [2]. Transmission of the pathogens occurs either by direct inoculation from the leech's mouthparts or via contamination of the wound with the water in which the leeches were stored.

Infections can occur 1 to 30 days post application of leeches and are associated with a dramatic decrease in flap salvage rates (88–30%) [2]. For these reasons, prophylactic antibiotics are widely recommended throughout the course of leech therapy [3]. Third-generation cephalosporins, fluoroquinolones, and cotrimoxazole have been administered, but fluoroquinolones have somewhat more limited applications because of resistance issues in *Aeromonas* species [3].

Herein, we describe a case of delayed breast reconstruction because of leech-borne infection involving an extensively drug-resistant strain of *Aeromonas hydrophila* producing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL).

On 22 December 2017, a 58-year-old woman was admitted to the Amiens University Hospital plastic and reconstructive surgery department for immediate unilateral breast reconstruction following mastectomy with a deep inferior epigastric artery perforator flap and silicone implant. A total of 25 leeches were applied onto the flap while dual prophylaxis with oral trimethoprim/sulfamethoxazole (80 mg/400 mg) and ofloxacin (200 mg) for 5 days was initiated on the first postoperative day because of partial congestion of the flap. Hirudotherapy was effective and the appearance of the flap rapidly improved. However, anaemia (haemoglobin, 8.5 g/dL) was detected on day 6, requiring transfusion of two units of packed red blood cells.

One month later, the patient presented partial flap necrosis associated with non-union of the mastectomy scar. Surgical revision with removal of the implant and flap, and reconstruction using an extended latissimus dorsi flap were then performed.

The laboratory work-up showed elevated C-reactive protein of 151 mg/L and a white blood cell count of  $30.10^3$  neutrophils/mm<sup>3</sup>. Surgical debridement was performed because of the presence of flap necrosis and pus. Three intraoperative bacteriological specimens (peri-prosthetic collection, wound, drainage fluid) were sent to the clinical bacteriology for examination.

Microscopic examination of these specimens showed a large number of white blood cells and numerous Gram-negative bacilli. Aerobic cultures on blood agar plates under aerobic conditions at

\* Corresponding author: F. Hamdad, Department of Clinical Bacteriology, Amiens-Picardie University Hospital, 80054, Amiens Cedex 1, France.

E-mail address: [Hamdad.Fa.ada@chu-amiens.fr](mailto:Hamdad.Fa.ada@chu-amiens.fr) (F. Hamdad).<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.006>

© 1998–2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

35°C grew colonies of *A. hydrophila*, which were identified at the species level by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry with a significant score of 2.3.

The strain was found to be resistant to ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, piperacillin, piperacillin/tazobactam, cefotaxime, cefepime, and aztreonam, but susceptible to ceftazidime (MIC = 1 mg/L), imipenem (0.38 mg/L), and meropenem (0.5 mg/L). A double-disc synergy test between third-generation cephalosporin and amoxicillin–clavulanic acid yielded a positive result, suggesting ESBL production. The bacterial strain was also resistant to ciprofloxacin (8.0 mg/L) and trimethoprim/sulfamethoxazole (32 mg/L) used for prophylaxis. IV therapy with ceftazidime 2 g and gentamicin 80 mg daily was subsequently initiated, resulting in clinical improvement.

Further investigations by PCR amplification and sequencing revealed the presence of two  $\beta$ -lactamase genes in the strain, one encoding narrow-spectrum penicillinase TEM-1 and the other coding for ESBL CTX-M-3.

Culture of a sample of the water in which the leeches were stored was then performed, revealing colonies of *A. hydrophila*, and one of them corresponding to *A. hydrophila* displayed the same resistance phenotype and produced acquired  $\beta$ -lactamases TEM-1 and CTX-M-3, thereby strongly supporting the notion that the patient had been infected by *A. hydrophila*-contaminated leeches. The mineral water used to fill the aquarium was also cultured and was sterile.

*Aeromonas* species are responsible for hirudotherapy-associated infections in 2.4–20% of treated patients, especially those with poorly vascularized flaps [4,5]. The benefit–risk balance should therefore be assessed before considering leech therapy, as infections are associated with prolonged hospital stay and failure of

reconstruction [2]. Pre-treatment external decontamination of these ectoparasites is recommended with 0.02% chlorhexidine solution for 10–15 s [5]. Antibiotic treatment of leeches has also been proposed to eradicate potential pathogens present in their gut. However, in the era of increasing antibiotic resistance, leeches can be vectors of bacteria harbouring genes of resistance to major antibiotics. Such infections may require revision of prophylactic protocols, such as microbiological assessment of the safety of leeches and detection of bacterial resistance to major antibiotics.

#### Transparency declaration

We declare no competing interests. No external funding was received.

#### References

- [1] Gideoglu K, Yildirim S, Akan M, Aköz T. Immediate use of medicinal leeches to salvage venous congested reverse pedicled neurocutaneous flaps. *Scand J Plast Reconstruct Surg Hand Surg* 2008;37:277–82.
- [2] Whitaker IS, Choumarzouk O, Rosen WM, Naderi N, Babsubramanian SP, Azzopardi EA, et al. The efficacy of medicinal leeches in plastic and reconstructive surgery: a systematic review of 277 reported clinical cases. *Microsurgery* 2012;32:240–50.
- [3] Byassi AR, Temes J, Rowshan HH. Medicinal leech therapy on head and neck patients: a review of literature and proposed protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;116:e167–72.
- [4] Herlin C, Bertheuil N, Bekara E, Boissière F, Sinna R, Chuput B. Leech therapy in flap salvage: systematic review and practical recommendations. *Ann Chir Plast Biêtr* 2017;62:e1–13.
- [5] Litwinowicz A, Blaszkowska J. Preventing infective complications following leech therapy: elimination of symbiotic *Aeromonas* spp. from the intestine of *Hirudo verbana* using antibiotic feeding. *Surg Infect* 2014;15:757–62.

presentations in the department was implemented: Amoxil (amoxicillin, measuring spoon) and Azimax (azithromycin, dose weight pipette).

**Results** A total of 77 mothers were included in the study. More than 75% (n=58) showed poor understanding of the intake method when we tried to have them repeat the dosing and administration schedule compared with the medical prescriptions they had. For 75.55% of the 45 mothers with a prescription containing Amoxil, the oral suspension, once reconstituted, was stored at room temperature when it required refrigeration (2–8°C). The response for the preservation of the two drugs after opening the vials was until expiration in 92.20% (n=71), while actually it is 7 days for Amoxil and 5 days for Azimax. Seventy-two interviewees thought that it was possible to exchange graduated pipettes. The Amoxil and Azimax reconstitutions were incorrect in 66.66% (30/45) and 81.25% (26/32) of cases, respectively, with the risk of overdose for Azimax (15/26) and underdosage for Amoxil (19/30). The preparation of the dose was incorrect in 60% of cases when using the dosing spoon with Amoxil and in 84.37% of cases when using the dosing pipette with Azimax.

**Conclusion and relevance** This study highlights the significant number of errors made by mothers during reconstitution and preparation of drugs, which requires the hospital pharmacist's involvement in educating families on the use of liquid oral forms.

#### REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS

No conflict of interest.

#### SP50-081 THE BENEFITS-RISKS BALANCE OF LEECH THERAPY IN ONE HOSPITAL: A RETROSPECTIVE STUDY

<sup>1</sup>A. Hime\*, <sup>2</sup>D. Flou, <sup>3</sup>K. Hedi, <sup>4</sup>R. Simo, <sup>5</sup>M. Behout, <sup>2</sup>F. Rousseau, <sup>2</sup>N. Lemaire, <sup>2</sup>F. Hamdi, <sup>1</sup>Amines Picarde University Hospital, Department of Pharmacy, Amiens, France; <sup>2</sup>Amines Picarde University Hospital, Department of Clinical Bacteriology, Amiens, France; <sup>3</sup>Amines Picarde University Hospital, Department of Plastic Surgery, Amiens, France

10.1136/bjpharm-2020-edhpcconf.286

**Background and importance** Venous congestion in transplanted or re-implanted tissues remains a common and challenging complication in reconstructive surgery. Medicinal leeches have been increasingly used for salvage of compromised pedicle flaps and microvascular free tissue transfers. However, leech therapy is associated with a number of risks, including significant blood loss requiring transfusion and infections, as leeches maintain a symbiotic relationship with *Aeromonas* species, which are residents of their gut, in order to digest blood. This bacterial species appears to be the commonest cause of leech related infection and can result in extensive soft tissue infection.<sup>1</sup>

**Aim and objectives** The aim of this study was to assess the benefits-risks of leech therapy. Indeed, in the era of increasing antibiotic resistance, leeches can be vectors of bacteria, harbouring resistance to major antibiotics. Thus we conducted a retrospective study on all patients who received leech therapy in our hospital, from 2010 to 2018.

**Material and methods** The purchase, maintenance and distribution of leeches in our hospital is centralised in the pharmacy from which the data on the numbers of leeches delivered to the clinical units, names of the patients and the number of leeches used per patient were obtained. We also performed a retrospective survey to assess the conditions of maintenance

and delivery of the leeches in the pharmacy and in the clinical units that used the most leeches.

**Results** Over 8 years, 42 patients were treated with an average of 34 leeches (5–126) over 2.5 days (1–12). The mean age of the patients was 48 years (34–93). There was a slight male predominance. Leeches were most commonly used by the plastic and reconstructive surgery unit. The success rate of leech therapy was 71.4%. However, 57% of patients developed anaemia, and 16.7% revealed *A. hydrophila* infections. All isolates were ticarcillin resistant, three were also fluoroquinolone resistant with one involving an extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing one.

**Conclusion and relevance** In the era of increasing antibiotic resistance and before use of medicinal leeches, prior screening of resistance by a local pharmaceutical team seems logical and necessary.

#### REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS

1. Whittaker S, et al. The efficacy of medicinal leeches in plastic and reconstructive surgery: a systematic review of 277 reported clinical cases. *Microsurgery* 2012;32:240-50.

No conflict of interest.

#### SP50-082 EVALUATING AN ELECTRONIC CLINICAL DECISION SUPPORT SYSTEM FOR DRUG-DRUG INTERACTIONS IN A LARGE ACUTE TEACHING HOSPITAL

N. Sato\*, B. Gan, G. Melarocopy, M. Herman, C. Gavin, St James's Hospital Dublin/In, The Dublin, Ireland

10.1136/bjpharm-2020-edhpcconf.289

**Background and importance** Drug-drug interactions (DDIs) are common and can result in preventable harm. Clinical decision support systems (CDSS) embedded within electronic prescribing software (eg DDI alerting tools) may improve clinical decision making. Studies have shown that prescribers override up to 96% of CDSS alerts and have questioned the usefulness of alerting systems.

**Aim and objectives** The study's objective was to evaluate the characteristics and override rates of DDI alerts following a recent implementation of a hospital wide electronic prescribing systems incorporating a DDI CDSS which was set to flag 'major contraindicated' drug combinations only.

**Material and methods** A retrospective analysis of DDI alerts generated by Cerner electronic prescribing software over a 6 week period in a haematology-oncology inpatient cohort was completed. A parallel review of DDIs highlighted by clinical pharmacists in the same patient cohort was undertaken and the results were compared.

**Results** There were 310 electronic DDI alerts generated. Of these, 58 alerts were redundant as they referred to duplicates within the same prescribing episode (n=22) or were not triggered by current medications (n=36). The remaining 252 alerts involved 38 individual medicines and 44 medication pairs. Antiemetic medications accounted for over 50% of alerts and QTc interval prolongation was the most frequently alerted drug interaction adverse outcome. In 44 instances (17%) either the original prescription or the interacting medicine was changed by the prescriber following the DDI alert, reflecting an override rate of 8.3% (n=208).

A total of 37 DDI alerts were flagged by clinical pharmacists in the study. There were 42 individual medicines and 37 medication pairs involved. In 5 instances (14%), a change was



FLOUG Quentin

**Hirudothérapie et risque infectieux, au CHU d'Amiens-Picardie.  
Proposition de mise en place de protocoles de surveillance bactériologique de l'eau de  
conservation et de décontamination des sangsues.**

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie  
Université de Picardie Jules Verne  
Année universitaire 2019/2020

**Mots-clés :** Hirudothérapie, sangsues, lambeaux, *Aeromonas*, infections, antibiorésistance, décontamination

**Résumé :**

Les sangsues sont des petits invertébrés hématophages qui sont utilisées en médecine en raison de leurs nombreuses propriétés, notamment anticoagulantes et anti-inflammatoires.

Actuellement, l'hirudothérapie ou thérapie par la sangsue est principalement indiquée en cas de congestion veineuse, dans le cadre de la reconstruction par lambeau ou de la réimplantation d'un membre.

Les *Aeromonas* sont des bactéries vivant en symbiose dans le tube digestif des sangsues, qui apportent des enzymes indispensables à la digestion du sang ingéré par l'annélide. Cependant, lors de la morsure de la sangsue, une infection cutanée à *Aeromonas* peut se produire, avec en conséquence, un risque important de rejet du lambeau.

En 2018, un cas clinique d'infection à *A. hydrophila*  $\beta$ -lactamase à spectre étendu liée aux sangsues, provoquant une nécrose partielle de lambeau, a été à l'origine d'une réflexion sur le sujet. Nous avons alors effectué une étude rétrospective observationnelle de l'utilisation de l'hirudothérapie et de ses conséquences, au CHU d'Amiens-Picardie, sur une période de 9 ans (2010- 2018). Dans cette étude, 27% des patients ont été infectés par *Aeromonas* et un lien a été montré entre l'échec de la reconstruction par lambeau et l'infection à *Aeromonas* ( $p < 0.006$ ).

Un des objectifs de ce travail de thèse est, également, de proposer des bonnes pratiques d'utilisation des sangsues (surveillance bactériologique de l'eau de conservation, décontamination externe) afin de réduire le risque infectieux lié à l'hirudothérapie et la résistance aux antibiotiques par le choix d'une antibioprophylaxie la mieux adaptée.

**Jury :**

**Président du jury : Pr. Gilles DUVERLIE**

**Directeur de thèse : Dr. Farida HAMDAD**

**Assesseurs : Pr. Nadine LEMAITRE**

**Dr. Hélène VACHER**