

## ARTICLE ORIGINAL

# La résistance à la fosfomycine chez les souches d'entérobactéries isolées au CHU Sahloul de Sousse.

## Fosfomycin resistance in enterobacteriaceae strains isolated at the CHU Sahloul of Sousse.

Khaouala Kochbati<sup>1,2</sup>  
Lamia Tilouche<sup>1,2</sup>  
Marwa Mahdouani<sup>3</sup>  
Sameh Boughattas<sup>1,2</sup>  
Safia Dahmen<sup>4</sup>  
Farah Azouzi<sup>2,5</sup>  
Soumaya Ketata<sup>1,2</sup>  
Abdelhalim Trabelsi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculté de pharmacie de Monastir  
(Tunisie), Université de Monastir

<sup>2</sup> Laboratoire de Microbiologie,  
CHU Sahloul de Sousse, Tunisie

<sup>3</sup> Institut supérieur des biotechnologies de Monastir.

<sup>4</sup> Institut supérieur des sciences appliquées et de technologie de Mahdia.

<sup>5</sup> Faculté de médecine de Sousse ,  
Université de Sousse

Reçu le 4 mai 2022 accepté  
le 24 septembre 2022

**Auteur correspondant :**  
Dr Lamia Tilouche

**Adresse :**  
Laboratoire de Microbiologie,  
CHU Sahloul de Sousse, Tunisie

**Courriel :** lamia\_312@hotmail.com

### Résumé

**Introduction :** Devant la propagation croissante du phénomène d'antibiorésistance et la stagnation de l'innovation pharmaceutique, un intérêt est porté aux anciennes molécules telle que la fosfomycine. Notre objectif était de dresser le profil épidémiologique et bactériologique de la résistance à la fosfomycine chez les souches d'entérobactéries isolées et d'évaluer la place de cette molécule par rapport aux autres antibiotiques habituellement testés.

**Matériel et méthodes :** Une étude descriptive rétrospective a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie sur une période de trois ans portant sur toutes les souches non redondantes des trois espèces d'entérobactéries les plus fréquemment isolées (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*). Les caractéristiques épidémiologiques et bactériologiques ont été recueillies à partir du logiciel informatique du laboratoire. L'identification ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ont été effectuées à l'aide du système VITEK 2<sup>®</sup>. La recherche des gènes de résistance aux bêta-lactamines et à la fosfomycine a été réalisée par PCR sur 47 souches multirésistantes aux antibiotiques.

**Résultats :** Parmi les 6141 souches d'entérobactéries incluses, *E. coli* était la moins résistante à la fosfomycine (1,1%) suivie de *K. pneumoniae* (22,7%). Les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* sécrétrices de bêta-lactamase à spectre étendu gardent une faible résistance à la fosfomycine tandis que la résistance parmi les souches d'*E. cloacae* (42,3%) et des souches résistantes aux carbapénèmes est élevée. Le gène *fosA* a été trouvé chez 26,3 % des souches de *K. pneumoniae* (n=38).

**Conclusion :** L'utilisation de la fosfomycine doit être promue selon une approche prudente en respectant les lignes directrices et les recommandations des sociétés savantes afin de prévenir l'émergence de la résistance à cette molécule.

**Mots clés :** fosfomycine, entérobactéries, antibiorésistance

### Abstract

**Introduction :** Faced with growing emergence of antibiotic resistance and stagnant pharmaceutical innovation, there is interest in old molecules such as fosfomycin. Our objective was to draw up the epidemiological and bacteriological profile of resistance to fosfomycin in our laboratory's isolated *Enterobacteriaceae* strains and to assess the place of this molecule compared to the other antibiotics usually tested.

**Material and methods :** A retrospective descriptive study was carried out in the microbiology laboratory over a period of three years on all non-redundant strains of the three most frequently isolated species of *Enterobacteriaceae* namely: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae*. Epidemiological and bacteriological characteristics were collected from the laboratory's computer software. The identification as well as the antibiotic sensitivity study were carried out using the VITEK 2<sup>®</sup> system. The search for beta-lactamase and fosfomycin resistance genes was carried out by PCR on 47 multi-resistant antibiotic strains.

**Results :** Among the 6141 *Enterobacteriaceae* strains included, *E. coli* was the least resistant to fosfomycin (1.1%) followed by *K. pneumoniae* (22.7%). Extended-spectrum beta-lactamase-secreting *E. coli* and *K. pneumoniae* strains retain low resistance to fosfomycin, while resistance among *E. cloacae* strains (42.3%) and carbapenem-resistant strains is high. The *fosA* gene was found in 26.3% of *K. pneumoniae* strains (n=38).

**Conclusion :** The use of fosfomycin must be promoted using a cautious approach, respecting the guidelines and recommendations of scholarly societies in order to prevent the emergence of resistance to this molecule.

**Keywords :** fosfomycin, *Enterobacteriaceae*, antibiotic resistance

**INTRODUCTION**

La résistance acquise aux antibiotiques, de plus en plus répandue, représente de nos jours une problématique majeure de santé publique. La prévalence de l’antibiorésistance augmente continuellement, principalement en raison de la pression de sélection exercée par la consommation d’antibiotiques (1).

Cette problématique est exacerbée par l’apparition de nouveaux phénotypes de résistance (2). Ce phénomène a touché presque toutes les espèces bactériennes dont les entérobactéries qui développent de plus en plus des mécanismes d’antibiorésistance avec en premier lieu, depuis le début des années 2000, l’émergence des CTX-M, nouvelles bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) qui ont une dissémination mondiale. Un autre phénomène préoccupant est la dissémination nosocomiale d’entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinase AmpC. Plus récemment, l’émergence de souches d’entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, par production de certaines bêtalactamases (BLSE et/ou AmpC hyper-produite) associée à une baisse de perméabilité membranaire ou par production de carbapénémases a posé le problème de la résistance aux carbapénèmes (1). Les traitements efficaces sur les entérobactéries multirésistantes s’amenuisent peu à peu. En contrepartie, l’innovation pharmaceutique est stagnante et les résistances ont largement devancé l’innovation. Le manque de développement de nouveaux antibiotiques actifs sur les bactéries multirésistantes tend à renouveler l’intérêt porté à d’anciennes molécules, et notamment la fosfomycine qui inhibe une étape précoce de la synthèse du peptidoglycane.

Dans ce contexte, il nous a paru pertinent de réaliser ce travail ayant pour objectifs de dresser le profil épidémiologique, bactériologique (y compris la génotypie) de la résistance à la fosfomycine chez les souches d’entérobactéries isolées au laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sahloul de Sousse et d’évaluer la place de cette molécule par rapport aux autres antibiotiques habituellement testés.

**MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Il s’agit d’une étude descriptive rétrospective réalisée au sein du laboratoire de microbiologie du CHU Sahloul

s’étalant sur une période de trois ans du 01/07/2018 au 30/06/2021 portant sur toutes les souches non redondantes des trois espèces d’entérobactéries les plus fréquemment isolées. Ces souches sont issues des cultures de prélèvements bactériologiques à visée diagnostique issus de tous les services de l’hôpital (hospitalisations, consultations externes et unités de soins intensifs). L’identification a été réalisée à l’aide de la carte d’identification des bacilles à Gram négatif (GN) de l’automate VITEK 2® (bioMérieux, France). L’étude de la sensibilité aux antibiotiques a été également effectuée à l’aide du VITEK 2® (bioMérieux) en utilisant les cartes AST-N 357. L’interprétation des résultats de l’antibiogramme a été faite conformément aux recommandations du CASFM/EUCAST de l’année en cours.

**Etude phénotypique**

La détection phénotypique des BLSE est guidée par les résultats de l’antibiogramme et souvent fournie par le système Expert de l’automate Vitek 2®. Elle a été réalisée moyennant le test de synergie ou en utilisant le kit commercialisé (AmpC + ESBL) (ROSCO® Diagnostica).

**Etude génotypique**

Pour l’étude génotypique, on a sélectionné au hasard 47 souches d’entérobactéries qui étaient à la fois résistantes à la fosfomycine et aux bêtalactamines (38 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 8 souches d’*Escherichia coli*, 1 souche d’*Enterobacter cloacae*). L’ADN bactérien est extrait par lyse thermique à partir d’une culture bactérienne de 18h sur gélose ordinaire. La recherche des gènes responsables de la résistance à la fosfomycine (*FosA*, *FosA3*, *FosC2* et *FosB*) et ceux responsables de la résistance aux bêta-lactamines (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> et *bla*<sub>OXA-48</sub>) a été réalisée, par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Un thermocycleur de marque Gene Amp PCR System 9700 a été utilisé pour cette étape du travail. Un mélange réactionnel classique d’un volume final de 25 µl a été préparé. La composition du mix est présentée dans le tableau 1 et les amorces utilisées sont données dans le tableau 2.

**Tableau 1: Composition du mélange réactionnel pour l’analyse moléculaire par PCR**

Composants	Volume pour un échantillon (µl)
Amorce sens (100µM/2µM)	2,5
Amorce anti-sens (100µM/2µM)	2,5
dNTP (100mM/2mM)	2,5
Mgcl2 (2mM)	1
Tampon de Taq (10X)	2,5
Taq (vitaTaq)	0,25
Eau	11,25

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées**

Amorces	Séquences d'amorces 5' - 3'	Gènes recherchés	T° (C°)	Taille de l'amplicon (pb)
FosA-F FosA-R	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCT ATGCCCGCATAGGGCTTCT	FosA	550	271
FosA3-F FosA3-R	GCGTCAAGCCTGGCATT GCCGTGAGGGTCGAGAAA	fosA3	552	282
FosC2-F FosC2-R	TGGAGGCTACTTGGATTTG AGGCTACCGCTATGGATTT	fosC2	550	209
FosB-F FosB-R	ATATGATCAAAGGAATAATC CATATGAAAATTCATATGAG	FosB	552	434
CTX-M-1-F CTX-M-1-R	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	blaCTX-M-1	555	864
CTX-M-9-F CTX-M-9-R	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA CCCTTCGGCGATGATTCTC	blaCTX-M-9	555	870
OXA-48-F OXA-48-R	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGC	blaOXA-48	558	716
CMY-2-F CMY-2-R	ATGATGAAAAAATCGATATG TTATTGCAGTTTTTCAAGAAT	blaCMY-2	555	1200

**Analyse statistique des données**

Les données relatives à l'écologie bactérienne et à l'antibiorésistance ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS 21. Les variables qualitatives ont été exprimées par leurs effectifs et leurs pourcentages qui ont été comparés en utilisant le test du khi-deux. Un seuil de signification de  $p < 0,05$  a été fixé.

**RÉSULTATS**

Nous avons recensé 6141 souches non redondantes d'entérobactéries. Les trois espèces bactériennes prédominantes étaient *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae* avec des fréquences d'isolement respectives de 53%, 22% et 7%. Les taux de résistance à la fosfomycine des trois principales entérobactéries isolées sont résumés au niveau du tableau 3. L'évaluation du taux de la résistan-

**Tableau 3: Résistance à la fosfomycine en fonction de l'espèce bactérienne**

	Nombre total de souches	Nombre de souches résistantes à la fosfomycine	Pourcentage de résistance	Valeur de p
<i>E.coli</i>	3145	35	1.1%	P <0,001*
<i>K. pneumoniae</i>	1305	296	22.7%	p<0,001**
<i>E. cloacae</i>	444	188	42.3%	
<b>Total</b>	4894	519	10.6%	

\*p : entre le taux de résistance à la fosfomycine chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*

\*\*p : entre le taux de résistance à la fosfomycine chez *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*

ce à la fosfomycine par rapport aux autres antibiotiques testés du panel des entérobactéries est illustrée au niveau de la figure 1. La résistance des souches d'*E. coli* (1,1%) à la fosfomycine est presque égale à celle des carbapénèmes et de la tigécycline, tandis qu'elle est inférieure à celle de la ciprofloxacine, des céphalosporines de troisième génération (C3G) et de l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole. Le taux de résistance des souches

de *K. pneumoniae* (22,7%) à la fosfomycine se situe entre ceux des carbapénèmes, de la tigécycline et de l'amikacine et ceux à la ciprofloxacine et aux C3G. Pour *E. cloacae*, la fosfomycine semble être la molécule la moins active *in vitro* (42,3%).

L'évolution de la résistance à la fosfomycine des trois entérobactéries étudiées ainsi que de chaque espèce à part est illustrée au niveau de la figure 2. On constate

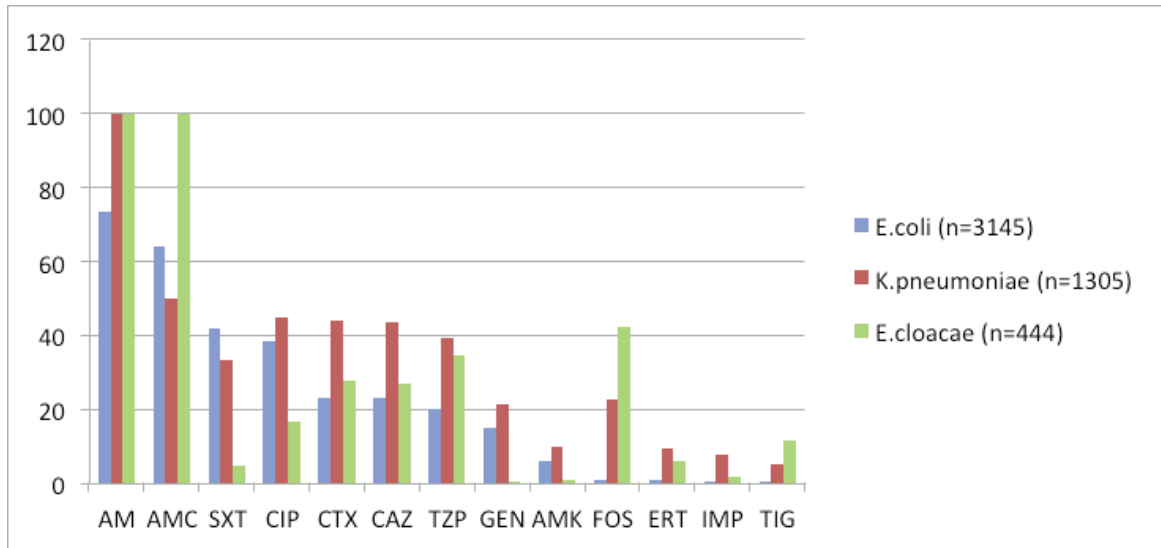


Figure 1: Profil de résistance des trois principales entérobactéries isolées aux différents antibiotiques

AM : amoxicilline, AMC : amoxicilline+acide clavulanique, TZP : pipéracilline-tazobactam, CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime, ERT : ertapénème, IMP : imipénème, TIG : tigécycline, AMK : amikacine, GEN : gentamicine, SXT : sulfaméthoxazole-triméthoprim, CIP : ciprofloxacine, Fos : fosfomycine.

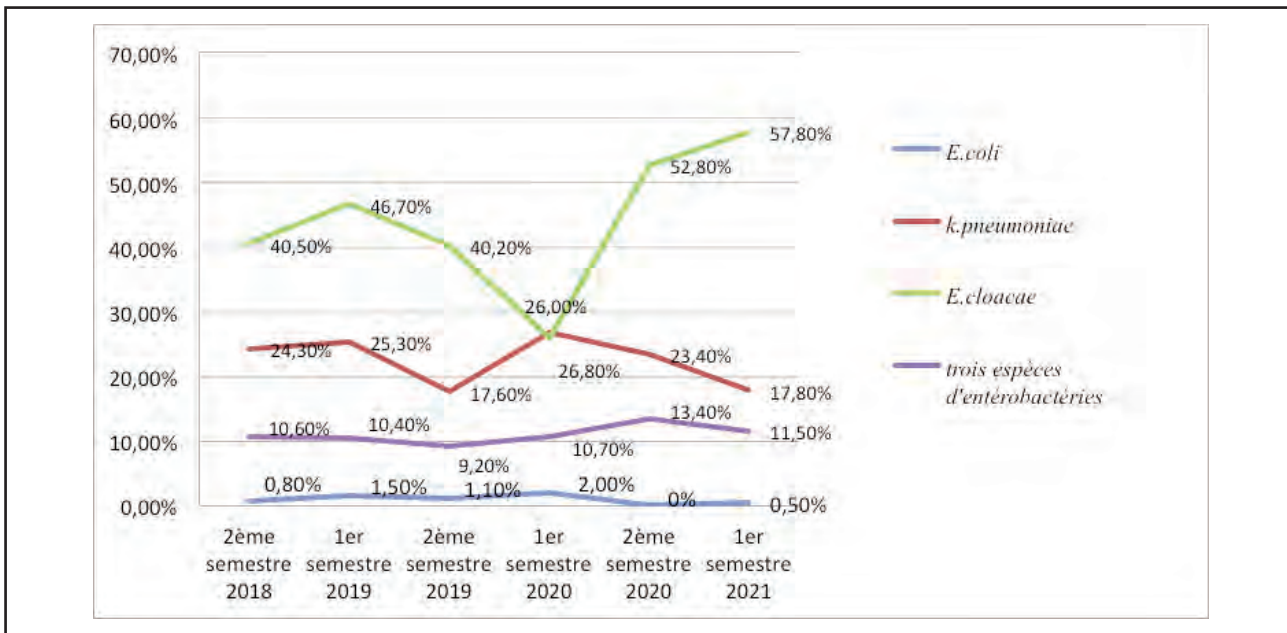


Figure 2: Evolution de la résistance de chaque bactérie au cours de la période d'étude

que le taux de résistance d'*E. coli* à la fosfomycine demeure faible tandis que le taux de résistance de *K. pneumoniae* connaît des fluctuations. Quant à *E. cloacae*, ce taux a augmenté considérablement passant de 40,5 % à la fin de l'année 2018 pour atteindre 57,6 % de résistance au début de 2021.

L'étude de la résistance à la fosfomycine des trois principales entérobactéries en fonction de la provenance du prélèvement: services d'hospitalisations, unités de soins intensifs ou consultations externes n'a montré aucune différence significative ( $p > 0.05$ ). Les résultats sont illustrés dans le tableau 4. Les taux de résistance les plus élevés sont observés aux services de neurochirurgie (28%), d'orthopédie (21,6%) et de néphrologie (16,7%). Les résultats de la comparaison des taux de résistance à la fosfomycine en fonction de phénotype de résistance

aux bêta-lactamines sont résumés dans le tableau 5. Notre étude n'a pas montré de différence significative entre les taux de résistance à la fosfomycine chez les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* sensibles aux C3G et celles productrices de BLSE ( $p > 0.05$ ). En revanche, on remarque une différence significative entre les taux de résistance à la fosfomycine chez les souches sensibles aux C3G et celles productrices de carbapénèmes pour les deux espèces *E. coli* et *K. pneumoniae*. *E. cloacae* a montré un taux de résistance de l'ordre de 44% indépendamment du profil de sensibilité aux bêta-lactamines qu'il s'agisse de souches sensibles aux C3G, résistantes aux C3G ( $p = 0,526$ ) ou résistantes aux carbapénèmes ( $p = 0,728$ ). Alors que des résultats négatifs ont été notés pour la recherche des gènes *FosA3*, *FosC2* et *FosB*, 10 souches hébergeaient le gène *FosA*. Il s'agis-

**Tableau 4: Etude de la résistance à la fosfomycine en fonction de l'origine des prélèvements**

Germe	Origine	Nombre de Souches Fos-R	Pourcentage de résistance	Valeur de p	
				H/C	H/USI
<i>E. Coli</i> (n=3145)	Services d'hospitalisation (n=1503)	17	1,1	0,997	0,666
	Consultation (n=1505)	17	1,1		
	Unités de soins intensifs (n=137)	1	0,7		
<i>K.pneumoniae</i> (n=1305)	Services d'hospitalisation (n=590)	135	22,9	0,592	0,681
	Consultations (n=527)	115	21,8		
	Unités de soins intensifs (n=188)	46	24,5		
<i>Enterobacter cloacae complex</i> (n=444)	Services d'hospitalisation (n=211)	88	47,7	0,441	0,08
	Consultations (n=144)	66	45,8		
	Unités de soins intensifs (n=89)	34	38,2		

Souches FOS-R : souches résistantes à la fosfomycine

H/C\* : valeur de p entre le taux de résistance des souches issues des services d'hospitalisation et celles des consultations externes

H/USI\*\* : valeur de p entre le taux de résistance des souches issues des services d'hospitalisation et celles des unités de soins intensifs

**Tableau 5: Taux de résistance à la fosfomycine des souches d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* en fonction du phénotype de résistance aux bêta-lactamines**

Espèce bactérienne	Phénotypes	Nombre de souches Fos-R	% de résistance à la fosfomycine	Valeur de p	
				*	**
<i>E.coli</i> (n=3105)	Sensible aux céphalosporines de 3ème génération (n=816)	8	1	0,082	<0,001
	BLSE (n=529)	1	0,2		
	CHN ou BLSE associée à une imperméabilité ou association de CHN et BLSE (n=168)	4	2,4		
	Carbapénémase (n=25)	9	36		
<i>K.pneumoniae</i> (n=1305)	céphalosporines de 3ème génération (n=440)	100	22,7	0,105	<b>0,009</b>
	BLSE (n=365)	66	18		
	CHN ou BLSE associée à une imperméabilité ou association de CHN et BLSE (n=82)	17	20,7		
	Carbapénémase (n=125)	43	34,4		

BLSE : bêta-lactamase à spectre étendu, CHN : céphalosporinase de haut niveau

\* valeur de p entre le taux de résistance à la fosfomycine chez les souches sensibles aux C3G et celles productrices de BLSE

\*\* valeur de p entre le taux de résistance à la fosfomycine chez les souches sensibles aux C3G et celles productrices de carbapénémases

sait de 10 souches de *K. pneumoniae* parmi les 38 incluses dans l'étude génotypique soit 26,3%. Les souches de *K. pneumoniae* qui possèdent le gène *fosA*, portent également soit le gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* ou le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, l'association *bla<sub>CTX-M-1</sub>* et *bla<sub>OXA-48</sub>*

ou l'association des gènes *bla<sub>CTX-M-1</sub>* et *bla<sub>CMY-2</sub>*. Trois souches produisaient une carbapénémase autre qu'OXA-48. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.



**Tableau 6 : Fréquence d'isolement du gène *fos-A* chez les souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* en fonction des phénotypes de résistance aux bêtalactamines**

Espèce	Résultat phénotypique	Résultat génotypique		Nombre total de souches	Nombre total de souches hébergeant le gène <i>fosA</i>	%
		Génotype	Nombre de souches			
<i>K.pneumoniae</i> (n=38)	BLSE	blaCTX-M-1 blaCTX-M-9	12 2	14	1	7,1
	BLSE+ Carbapénémase	blaCTX-M-1 blaCTX-M-9 blaOXA-48	10	12	5	41.7
	BLSE+ céphalosporinase	blaCTX-M-1 + blaCMY-2	4	4	1	25
	Carbapénémase Céphalosporinase de haut niveau	ND blaCMY-2	0 2	6 2	3 0	50 0
<i>E.coli</i> (n=8)	BLSE	blaCTX-M-9	2	2	0	0
	Carbapénémases	ND		3	0	0
	Carbapénémases + BLSE	blaCTX-M-1 blaCTX-M-9	2 1	3	0	0
<i>E.cloacae</i> (n=1)	Carbapénémase	ND		1	0	0

ND : gène non déterminé (autre que OXA-48)

## DISCUSSION

L'émergence croissante d'antibiorésistance, non accompagnée de la mise sur le marché de nouvelles classes d'antibiotiques, a incité à réévaluer l'activité de nombreuses anciennes molécules dont la fosfomycine. C'est un antibiotique bactéricide découvert pour la première fois en 1969. Son utilisation a rapidement été éclipsée par la découverte des céphalosporines (3). L'activité bactéricide rapide de la fosfomycine est due à un mécanisme d'action unique. En effet, elle inhibe une réaction catalysée par l'enzyme MurA (UDP-N-acétylglucosamine énoylpyruvyl transférase), responsable de la première étape de synthèse du peptidoglycane (1). De plus, pour pénétrer à l'intérieur de la bactérie, la fosfomycine utilise deux transporteurs de sucres situés dans la membrane

cytoplasmique : GlpT (transporteur du glycérol-3-phosphate), d'expression partiellement constitutive et uhpT (transporteur du glucose-6-phosphate [G6P]), inducible par la présence de son substrat le G6P (4). Sur le plan pharmacocinétique, elle a une bonne diffusion dans les tissus et atteint des concentrations suffisantes dans le sérum, les abcès et le système rénal et cardiorespiratoire (5). La fosfomycine présente plusieurs avantages : son existence sous forme orale contrairement aux carbapénèmes et à la tigécycline administrées uniquement sous forme parentérale, sa bonne tolérance et son effet minime sur le microbiote intestinal. Elle n'est pas néphrotoxique et elle peut être administrée à la femme enceinte (1). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé la fosfomycine dans la catégorie des antimicrobiens

«d'importance critique» compte tenu de son efficacité sur les bacilles à Gram négatif multirésistants (6). Notre étude a montré un taux de résistance global de 10,6 % chez les trois espèces prédominantes. Le taux de résistance le moins élevé était trouvé chez les souches d'*E. coli* (1,1%) suivi du taux de résistance des souches de *K. pneumoniae* (22,7%). Ce taux est en revanche considérable chez les souches d'*E. cloacae* (>40%). Ce faible taux de résistance, notée chez *E. coli*, a été rapporté dans de nombreuses études réalisées dans différents pays du monde (Turquie, France, Pays-Bas, Corée du sud et Amérique du sud) (7-11). Ces mêmes études ont rapporté des taux de résistance variables chez les espèces d'*E. cloacae* et de *K. pneumoniae* (allant de 4% jusqu'à 46,9%). Cette différence pourrait être expliquée entre autre par les divergences entre les valeurs des concentrations critiques de la fosfomycine proposées par les comités d'experts. Il est à noter, qu'une souche d'entérobactérie est définie, selon l'EUCAST 2020, résistante si sa CMI est supérieure à 32 mg/L pour la fosfomycine en intraveineux (12). Tandis qu'une souche est considérée résistante selon les critères du CLSI 2020 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) si sa CMI est supérieure à 256 mg/L (13). Il est aussi important de mentionner que les valeurs de CMI 50 et CMI 90 rapportées chez *E. coli* sont généralement faibles (< 2-4 mg/L). Ainsi, l'utilisation des critères de l'EUCAST ou de CLSI dans l'interprétation n'interfère pas dans la catégorisation des souches d'*E. coli* vu qu'elles ont des valeurs de CMI faibles. D'où la faible résistance des souches d'*E. coli* à la fosfomycine observée dans toutes les études indépendamment de la divergence des critères d'interprétation (14). En ce qui concerne *K. pneumoniae*, la plupart des études ont rapporté des valeurs de CMI 50 et de CMI 90 élevées (14). En ce qui concerne le profil de sensibilité aux antibiotiques d'*E. coli* dans notre travail, la fosfomycine figure parmi les antibiotiques ayant des taux de résistance inférieurs à 10 %. Selon une étude canadienne, la résistance antimicrobienne à la fosfomycine est rare chez *E. coli* (<1%), tandis que la résistance aux fluoroquinolones et au triméthoprime-sulfaméthoxazole est fréquente et ne cesse d'augmenter (15). Selon les données du réseau de l'antibiorésistance en Tunisie (LART) publiées en 2017, la résistance des souches d'*E. coli* à la ciprofloxacine est estimée à 25,2% et elle atteint 41,8% pour l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (16). Mais ce réseau ne donne aucune indication sur le taux de résistance à la fosfomycine.

La résistance à la fosfomycine chez *K. pneumoniae* a connu des fluctuations. Une étude menée en Pologne pendant une période de 9 ans de 2011 à 2020 sur des souches de *K. pneumoniae* multirésistantes responsables d'infections nosocomiales n'a pas montré une tendance à la hausse dans les taux de résistance (17). A noter que la période de notre étude est courte et ne permet pas d'avoir des résultats concluants quant à l'évolution de la résistance. L'étude des taux de sensibilité à la fosfomycine des trois souches isolées selon leur provenance n'a

montré aucune différence significative ( $p > 0,05$ ).

Nos résultats ne concordent pas avec ceux obtenus dans une étude au Kenya où les souches originaires des services d'hospitalisation ont montré un taux de résistance supérieur à celui des souches communautaires (19% *versus* 6% respectivement;  $p=0,0015$ ) (18).

La disparité dans les taux de résistance selon le service d'hospitalisation pourrait être expliquée par les hypothèses suivantes : l'émergence des bactéries multirésistantes dans les services ayant le taux de résistance le plus élevé à la fosfomycine, la longue durée d'hospitalisation des patients séjournant dans ces services, une grande consommation de fosfomycine dans les services où sont enregistrés les résistances les plus élevées. A titre d'exemple, la fosfomycine s'utilise fréquemment dans le traitement des infections ostéoarticulaires et les infections pulmonaires. De même, elle est bien tolérée en pédiatrie (19).

Ces hypothèses devraient être consolidées par l'étude de l'écologie bactérienne au cours de la période d'étude dans les services d'hospitalisation ainsi que par l'étude de la relation consommation fosfomycine et sélection de bactéries mutantes. Une étude menée au sein de 9 hôpitaux espagnols portant sur 231 souches urinaires d'*E. coli* sécrétrices de BLSE, a montré que la résistance à la fosfomycine est passée de 4,4% en 2005 à 11,4% en 2009. Cette augmentation est positivement corrélée à l'augmentation de la consommation de la fosfomycine qui a augmenté parallèlement allant de 0,05 dose définie journalière (DDJ) par mille habitants en 1997 à 0,22 DDJ en 2008 (20). Ces résultats ne concordent pas avec ceux d'autres études réalisées aux Pays-Bas et au Japon, pays qui consomment de façon considérable la fosfomycine mais où les taux de résistance enregistrés demeurent bas (21, 22).

Notre étude n'a pas montré de différence significative ( $p=0,082$ ) entre les souches sauvages d'*E. coli* et les souches sécrétrices de BLSE qui présentent un pourcentage de résistance faible (0,2%) à la fosfomycine. Chez les souches de *K. pneumoniae* sécrétrices de BLSE, le taux de résistance à la fosfomycine est de 18.1%. La différence entre les taux de résistance à la fosfomycine n'est pas significative entre souches sauvages et souches de *K. pneumoniae* sécrétrices de BLSE ( $p=0,105$ ). Falagas *et al.* (23) ont analysé les résultats de 17 études qui ont évalué l'activité antimicrobienne de la fosfomycine. Ils ont trouvé que seulement 3,2% des isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE et 18,7% des isolats de *K. pneumoniae* producteurs de BLSE sont résistants à la fosfomycine. Dans une autre étude, Fajfr *et al.* ont démontré que la résistance à la fosfomycine est la même, que la souche soit productrice de BLSE ou pas. Ils ont indiqué que la production d'une bêta-lactamase n'est pas un mécanisme de résistance corrélé à la résistance à la fosfomycine(24). En revanche, une augmentation significative dans les taux de résistance des souches *E. coli* et *K. pneumoniae* bêta-lactamases positives a été



observée dans une étude en Turquie (7). Ce dernier résultat amène à penser à une éventuelle co-association entre les gènes qui codent pour une bêta-lactamase et les gènes qui codent pour une enzyme inactivatrice de la fosfomycine. En effet, la fosfomycine présente deux mécanismes de résistance chromosomiques soit par diminution de la perméabilité à la fosfomycine, soit par modification de la cible mur-A et un mécanisme plasmidique qui consiste en la présence d'enzymes modifiant la fosfomycine et l'inactivant (25, 26). Les trois principales enzymes rapportées sont : fosA, fosB et fosX (27). L'enzyme plasmidique la plus préoccupante est celle codée par le gène *fosA3*, le variant de *fosA* le plus prévalent. Ce gène peut être localisé sur le même plasmide que les gènes *bla<sub>CTX-M</sub>* codant pour une BLSE. Cette enzyme inactive la fosfomycine par son activité glutathion S-transférase. Elle a été trouvée initialement au Japon chez des souches d'*E. coli* sécrétrices de CTX-M. Elle a été, par la suite, trouvée chez des animaux et chez des patients dans de nombreux pays asiatiques (28). Une étude coréenne a montré que les taux de résistance chez les souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* productrices de BLSE étaient faibles (4,2% et 5,5% respectivement), mais jusqu'à 62,5% et 15,4% des isolats d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* résistants à la fosfomycine, respectivement, abritaient le gène *fosA3* à médiation plasmidique. Les gènes *fosA3* sont toujours co-localisés avec *bla<sub>CTX-M</sub>* sur les mêmes plasmides (29). En 2016, au Portugal, une étude a rapporté la première souche d'*E. coli* qui exprime à la fois *fosA3* et CTXM-15 (30). En France, une étude a montré que 83% des souches d'*E. coli* sécrétrices de BLSE étudiées sont *fosA*-positives (8). Toutes ces études incitent à la prudence malgré le taux de sensibilité rassurant à la fosfomycine observé dans notre étude. Compte tenu de la propagation des infections dues aux CTX-M communautaires, l'utilisation de la fosfomycine surtout sous forme orale est susceptible de favoriser les coproducteurs de CTX-M-FosA, aboutissant ainsi à la perte de son efficacité (8).

D'après les résultats de notre étude génotypique, on a noté que les souches qui hébergeaient le gène *FosA* ont présenté aussi le plus souvent le gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* ou le gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, l'association des gènes *bla<sub>CTX-M-1</sub>+bla<sub>OXA-48</sub>* ou l'association des gènes *bla<sub>CTX-M-1</sub>+bla<sub>CMY-2</sub>*. Ces gènes pourraient être situés alors sur le même plasmide. Ceci concorde avec l'étude réalisée à Taiwan en 2013 qui a montré que parmi 123 souches résistantes à la fosfomycine isolées à partir de deux hôpitaux, 28 isolats ont présenté le gène *bla<sub>CTX-M-1</sub>* avec une faible expression du gène *bla<sub>CTX-M-9</sub>* (31). Notre étude a de même montré que les souches résistantes aux carbapénèmes ont présenté des taux de résistance significativement plus élevés que ceux trouvés chez les souches sauvages d'*E. coli* (36%) et de *K. pneumoniae* (34,3%). Une étude Américaine a rapporté en revanche que les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes avaient un taux de résistance de

l'ordre de 15% à la fosfomycine (32). Des taux de résistance encore plus faibles chez des souches résistantes aux carbapénèmes ont été observés dans une étude Anglaise avec 0 % de résistance chez *E. coli* et 20% chez *E. cloacae* tandis que *K. pneumoniae* était l'espèce la moins sensible (35%) (33). Une étude chinoise a montré que la résistance à la fosfomycine parmi les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes était de 80%. Le pourcentage des souches porteuses du gène *fosA* était de 36,3% selon cette même étude (34). Une autre étude chinoise a trouvé que plus de 9% des isolats de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes *fosA3* positifs co-abritaient le gène *Bla KPC-2*. Ceci montre la forte incidence de la co-dissémination de ces deux gènes et confirme la théorie selon laquelle *fosA3* joue un rôle dans le transfert de la résistance à la fosfomycine (35). Dans d'autres études, les résultats du typage *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), ont indiqué que la résistance à la fosfomycine se propage principalement par dissémination clonale (36, 37).

Toutes ces données nous ont amené à émettre l'hypothèse que les fluctuations des taux de résistance à la fosfomycine, observées dans notre étude, pourraient être dues à des épidémies hospitalières à souches productrices de carbapénémases ou de BLSE, étant donné que les gènes de résistance sont co-localisés sur le même plasmide.

L'étude génomique réalisée dans notre laboratoire a révélé que 10 souches parmi les 38 souches de *K. pneumoniae* hébergeaient le gène *fosA* soit 26,3%. Pour les souches *fosA* négatives, il peut s'agir d'un autre mécanisme de résistance non enzymatique qui pourrait être lié à la diminution de la perméabilité membranaire à cette molécule soit par des mutations chromosomiques ou par une modification de la cible par des mutations touchant le gène *MurA*. Comparativement à la résistance à la fosfomycine médiée par un mécanisme chromosomique chez *K. pneumoniae*, la résistance à la fosfomycine à médiation plasmidique (*fosA3*) génère des CMI plus élevées (36).

Les carbapénèmes étaient longtemps considérés comme le traitement de référence des infections causées par les entérobactéries sécrétrices de BLSE. Cependant, leur effet sur l'écologie microbienne en particulier sur le microbiote intestinal est important. De plus, il y a une dissémination rapide et incontrôlée des souches productrices de carbapénémase en particulier dans les pays en voie de développement. Les entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) sont responsables d'épidémies hospitalières et ont été associées à une augmentation de la mortalité, de la durée du séjour et des coûts (38). Cette augmentation de la résistance aux carbapénèmes est corrélée positivement à l'augmentation de leur consommation ce qui incite à mieux rationaliser leur utilisation afin de préserver leur action (39). Senol *et al.*, dans une étude prospective, ont comparé l'efficacité clinique (définie par la résolution des symptômes) et microbiologique (définie par l'obtention d'une culture

d'urine de contrôle négative réalisée 7 à 9 jours après l'arrêt du traitement) de la fosfomycine (3g par jour J1, J3 et J5) et des carbapénèmes utilisés pendant 14 jours sur des souches urinaires d'*E. coli* sécrétrices de BLSE. La réponse clinique et microbiologique chez les groupes ayant consommé la fosfomycine et ceux ayant pris les carbapénèmes était similaires (95% versus 78%) et (80% versus 59%). La fosfomycine est donc une bonne alternative des carbapénèmes pour le traitement des infections à *E. coli* sécrétrices de BLSE (40).

Notre étude comporte certaines limites, il s'agit d'une étude monocentrique qui s'est étalée sur seulement 3 années, période insuffisante pour suivre l'évolution de la résistance à la fosfomycine. L'étude de la sensibilité à la fosfomycine a été déterminée par le système automatisé Vitek 2<sup>à</sup> tandis que la méthode de référence recommandée par l'EUCAST est la dilution en milieu gélosé en présence de 25 mg/L de Glucose-6-phosphate. L'étude de la corrélation entre la consommation de la fosfomycine au niveau des services d'hospitalisation et le taux d'incidence de résistance n'a pas été réalisée. Cela aurait pu expliquer les fluctuations au niveau des taux de résistance à la fosfomycine au fil des années dans notre structure hospitalière.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pourbaix A, Guérin F. Fosfomycine, place et intérêt dans un contexte de multirésistance. *J Anti Infect.* 2016;18(3):85-97.
2. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455-478.
3. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, *et al.* Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Science.* 1969;166:122-113.
4. Eschenburg S, Priestman M, Schönbrunn E. Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J Biol Chem.* 2005;280:3757-3763.
5. Kühnen E, Pfeifer G, Frenkel C. Penetration of fosfomycin into cerebrospinal fluid across non-inflamed and inflamed meninges. *Infection.* 1987;15:422-424.
6. Collignon PC, Conly JM, Andreumont A, McEwen SA, Aidara-Kane A, Agerson Y, *et al.* World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clin Infect Dis.* 2016;63:1087-1093.
7. Simsek M. Sensitivity of extended spectrum of beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species to Fosfomycin. *J Pak Med Assoc.* 2020;70:1187-1192.
8. Benzerara Y, Gallah S, Hommeril B, Genel N, Decré D, Rottman M, *et al.* Emergence of plasmid-mediated fosfomycin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1564-1567.
9. van den Bijllaardt W, Schijffelen MJ, Bosboom RW, Cohen Stuart J, Diederens B, Kampinga G, *et al.* Susceptibility of ESBL *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin in the Netherlands and comparison of

## CONCLUSION

Peu d'études tunisiennes se sont intéressées à l'évaluation de la sensibilité des entérobactéries à la fosfomycine. Cette dernière de par son large spectre d'action et son faible taux de résistance, s'est avérée être une molécule efficace du moins *in vitro* pour le traitement des infections à *E. coli* et à *K. pneumoniae* et même celles sécrétrices de bêta-lactamases à spectre étendu dans ce présent travail. Ceci est d'autant plus important que les taux de résistance aux autres antibiotiques ne cessent d'augmenter. En tant que pays en voie de développement, l'augmentation de la résistance aux antibiotiques risque d'alourdir considérablement le budget de la santé. Notre objectif n'était pas de promouvoir l'utilisation irrationnelle de la fosfomycine mais plutôt d'étudier sa place dans le traitement des infections bactériennes dans notre structure hospitalière. L'utilisation de la fosfomycine doit être donc promue selon une approche prudente en respectant les lignes directrices et les recommandations des sociétés savantes afin de prévenir l'émergence de la résistance à cette molécule.

several testing methods including Etest, MIC test strip, Vitek2, Phoenix and disc diffusion. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73:2380-2387.

10. Seok H, Choi JY, Wi YM, Park DW, Peck KR, Ko KS. Fosfomycin resistance in *Escherichia coli* isolates from South Korea and *in vitro* activity of fosfomycin alone and in combination with other antibiotics. *Antibiotics (Basel).* 2020;9:112.
11. Flamm R, Shortridge D, Rhomberg PR, Sweeney K, Ellis-Grosse EJ, Sader HS. Fosfomycin Activity when tested against Gram-positive and Gram-negative US isolates collected by the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Proceedings of the ASM Microbe, New Orleans, Louisiana.* [En Ligne]. 2017 [Consulté le 05/01/2022], disponible à l'URL: <https://www.jmilabs.com/data/posters/ASMMicrobe17-fosfo-vs-GP-GN.pdf>
12. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations 2020 V.1.1 Avril.* [En Ligne]. 2020 [Consulté le 05/01/2022], disponible à l'URL: [https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2020/04/CASFM2020\\_Avril2020\\_V1.1.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf)
13. Clinical and laboratories standards institute. *Recommandations 2020.* Janvier. [En Ligne]. 2020 [Consulté le 05/01/2022], disponible à l'URL: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
14. Vardakas KZ, Legakis NJ, Triarides N, Falagas ME. Susceptibility of contemporary isolates to fosfomycin: a systematic review of the literature. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:269-285.
15. Karlowsky JA, Denisuk AJ, Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, *et al.* *In vitro* activity of fosfo-

mycin against *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections in Canada as part of the CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:1252-1256.

16. LART. Données de 2017. *E. coli* (N=8266) [ En ligne]. [Consulté le 26/04/2022]. Disponible : [https://www.infectiologie.org.tn/pdf\\_ppt\\_docs/resistance/1544218337.pdf](https://www.infectiologie.org.tn/pdf_ppt_docs/resistance/1544218337.pdf)

17. Mączyńska B, Paleczny J, Oleksy-Wawrzyniak M, Choroszy-Król I, Bartoszewicz M. In vitro susceptibility of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial infections to fosfomycin. A comparison of determination methods. *Pathogens.* 2021;10:512.

18. Williams PCM, Waichungo J, Gordon NC, Sharland M, Murunga S, Kamau A, et al. The potential of fosfomycin for multi-drug resistant sepsis: an analysis of in vitro activity against invasive paediatric Gram-negative bacteria. *J Med Microbiol.* 2019;68:711-719.

19. Baquero-Artigao F, Rabes T del R. Fosfomycin in the pediatric setting: Evidence and potential indications. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32(Suppl 1):55-61.

20. Oteo J, Bautista V, Lara N, Cuevas O, Arroyo M, Fernández S, et al. Parallel increase in community use of fosfomycin and resistance to fosfomycin in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:2459-2463.

21. Knottnerus BJ, Nys S, Ter Riet G, Donker G, Geerlings SE, Stobberingh E. Fosfomycin tromethamine as second agent for the treatment of acute, uncomplicated urinary tract infections in adult female patients in The Netherlands? *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(2):356-359.

22. Hara T, Araake M, Watabe H. Antibacterial activities of fosfomycin against several fresh clinical isolates--comparison of the test methods for antibacterial activity. *Jpn J Antibiot.* 2002;55:844-854.

23. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum beta-lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:43-50.

24. Fajfr M, Louda M, Paterová P, Ryšková L, Pacovský J, Košina J, et al. The susceptibility to fosfomycin of Gram-negative bacteria isolates from urinary tract infection in the Czech Republic: data from a unicentric study. *BMC Urol.* 2017;17:33.

25. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:2850-2858.

26. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, et al. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int Antimicrob Agents.* 2010;35:333-337.

27. Arca P, Reguera G, Hardisson C. Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:393-399.

28. Xiang DR, Li JJ, Sheng ZK, Yu HY, Deng M, Bi S, et al. Complete sequence of a novel IncR-F33:A-B- Plasmid, pKP1034, Harboring fosA3, blaKPC-2, blaCTX-M-65, blaSHV-12, and rmtB from an epidemic *Klebsiella pneumo-*

*niae* sequence type 11 strain in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:1343-1348.

29. Lee SY, Park YJ, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, et al. Prevalence of acquired fosfomycin resistance among extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding fosA3. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2843-2847.

30. Mendes AC, Rodrigues C, Pires J, Amorim J, Ramos MH, Novais A, et al. Importation of fosfomycin resistance fosA3 gene to Europe. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:346-348.

31. Tseng SP, Wang SF, Kuo CY, Huang JW, Hung WC, Ke GM, et al. Characterization of Fosfomycin Resistant Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human and Pig in Taiwan. *PLoS ONE.* 2015;10(8):e0135864.

32. Pogue JM, Marchaim D, Abreu-Lanfranco O, Sunkara B, Mynatt RP, Zhao JJ, et al. Fosfomycin activity versus carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and vancomycin-resistant Enterococcus, Detroit, 2008-10. *J Antibiot.* 2013;66:625-627.

33. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37:415-419.

34. Huang L, Cao M, Hu Y, Zhang R, Xiao Y, Chen G. Prevalence and mechanisms of fosfomycin resistance among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;57:106226.

35. Liu P, Chen S, Wu ZY, Qi M, Li XY, Liu CX. Mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;22:238-243.

36. Chen J, Wang D, Ding Y, Zhang L, Li X. Molecular epidemiology of plasmid-mediated fosfomycin resistance gene determinants in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Microb Drug Resist.* 2019;25:251-257.

37. Lu PL, Hsieh YJ, Lin JE, Huang JW, Yang TY, Lin L, et al. Characterisation of fosfomycin resistance mechanisms and molecular epidemiology in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Int J Anti-microb Agents* 2016;48:564-568.

38. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1099-1106.

39. Barchitta M, Mageri A, La Rosa MC, La Mastra C, Murolo G, Basile G, et al. Carbapenem Consumption and Rate of carbapenem resistant Gram-negative bacteria: results from the Sicilian Surveillance System. *Ann Ig.* 2021;33:289-296.

40. Senol S, Tasbakan M, Pullukcu H, Sipahi OR, Sipahi H, Yamazhan T, et al. Carbapenem versus fosfomycin tromethamine in the treatment of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*-related complicated lower urinary tract infection. *J Chemother.* 2010;22:355-357.