

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

Ασυμπτωματική βακτηριουρία των ηλικιωμένων, αντοχή στα αντιβιοτικά και σημασία των integrons

ΣΚΟΠΟΣ Η ασυμπτωματική βακτηριουρία (AB) είναι ιδιαίτερα συχνή κατάσταση στην τρίτη ηλικία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή της επίπτωσης της AB σε τρεις πληθυσμούς ασθενών, της κοινότητας, του γηροκομείου και του νοσοκομείου, καθώς και η περιγραφή της έκτασης της μικροβιακής αντοχής και των μηχανισμών που την προκαλούν. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Κατά το χρονικό διάστημα από Οκτώβριο 2002 έως Ιούλιο 2003 συλλέχθηκαν ούρα από ασυμπτωματικά άτομα, ηλικίας >60 ετών. Τα δείγματα ελήφθησαν από άτομα που διέμεναν σε γηροκομείο, από άτομα που διέμεναν στην κοινότητα και από νοσηλεύομενους ασθενείς σε παθολογική κλινική. Από όσους ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης AB, έγινε συλλογή των στελεχών και προσδιορισμός της ευαισθησίας. Στα στελέχη *Enterobacteriaceae* έγινε δοκιμασία παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμάσης (ESBL), μεταλλο-β-λακταμάσης (MBL) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την παρουσία integrons. Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με το πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v 12.0 για Windows. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Κατά τη διάρκεια της μελέτης ελήφθησαν δείγματα ούρων για καλλιέργεια από 638 άτομα, από τα οποία 186 διέμεναν σε γηροκομείο, 323 διέμεναν στην κοινότητα και 129 νοσηλεύονταν σε παθολογική κλινική. Η μέση ηλικία ανερχόταν στα 71,08±9,19 έτη. Ο επιπολασμός της AB ήταν: 13,6% για τους ασθενείς της κοινότητας, 30,6% για τους ασθενείς του γηροκομείου και 27,9% για τους νοσηλεύομενους ασθενείς. Τα μικροβιακά αίτια AB κατά σειρά συχνότητας ήταν η *E. coli*, οι εντερόκοκκοι, ο *P. mirabilis* και η *K. pneumoniae*. Από τα στελέχη του γηροκομείου ανιχνεύτηκε παραγωγή ESBL στο 21,1%, από τα στελέχη της κλινικής στο 25,8%, ενώ κανένα στέλεχος της κοινότητας δεν παρήγαγε ESBL. Δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή MBL. Από τα στελέχη *Enterobacteriaceae*, το 22,3% περιείχε integrons, και συγκεκριμένα 11,1% των στελεχών της κοινότητας, 23,5% του γηροκομείου και 36% του νοσοκομείου. Τα στελέχη που περιείχαν integrons εμφάνιζαν συχνότερα αντοχή στις περισσότερες ομάδες των αντιμικροβιακών. Επί πλέον, η παρουσία πολυαντοχής (70,8% έναντι 8,9%, $p < 0,001$, OR: 24,99, 95% CI: 7,73–80,76) και ESBL (50% έναντι 6,3%, $p < 0,001$, OR: 14,8, 95% CI 4,42–49,56) ήταν συχνότερη σε στελέχη που περιείχαν integrons. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η συχνότητα της AB σε τρόφιμους γηροκομείου είναι παρόμοια με αυτή των νοσηλευομένων σε νοσοκομείο ασθενών. Η παραγωγή ESBL και η παρουσία integrons είναι ιδιαίτερα συχνές σε στελέχη *Enterobacteriaceae* από γηροκομεία, ενώ υπάρχει δεξαμενή integrons και στην κοινότητα. Η παρουσία integrons σχετίστηκε με πολυαντοχή. Οι ασθενείς που προέρχονται από γηροκομείο θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως νοσοκομειακοί.

Η ασυμπτωματική βακτηριουρία (AB) αποτελεί ιδιαίτερα συχνή κατάσταση σε άτομα με προδιαθεσικούς παράγοντες. Ο επιπολασμός της ποικίλλει ανάλογα με το

φύλο, την ηλικία και την παρουσία ανατομικών ανωμαλιών και νόσων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης.¹ Ιδιαίτερη προδιάθεση εμφανίζουν τα ηλικιωμένα άτομα, τόσο στην

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2011, 28(4):529–536
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2011, 28(4):529–536

**Β. Νάστος,
Χ. Κοσμίδης,
Μ. Γραμματικού,
Γ. Πετρίκκος,
Γ.Λ. Δαΐκος**

Ερευνητικό Εργαστήριο Λοιμώξεων και Αντιμικροβιακής Χημειοθεραπείας, «Γ.Κ. Δαΐκος», Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Asymptomatic bacteriuria of the elderly; antimicrobial resistance and the importance of integrons

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αντοχή
Ασυμπτωματική βακτηριουρία
Integrons

Υποβλήθηκε 11.10.2010
Εγκρίθηκε 29.10.2010

κοινότητα όσο και σε γηροκομεία.² Η παρουσία της AB σε αυτούς τους πληθυσμούς έχει συνδεθεί με επιπλοκές, όπως η οξεία συμπτωματική λοίμωξη του ουροποιητικού, η νεφρική ανεπάρκεια και η αυξημένη θνητότητα.³ Επί πλέον, συμβάλλει στη διασπορά της αντιμικροβιακής αντοχής με τη μετάδοση των μικροβίων από ασθενή σε ασθενή σε περιβάλλοντα, όπως το γηροκομείο ή το νοσοκομείο, αλλά και εξ αιτίας της χορήγησης και συχνά κατάχρησης αντιβιοτικών για την αντιμετώπισή της.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν αρκετές αναφορές για το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στη διάδοση της αντοχής μεταξύ *Enterobacteriaceae* δομές DNA που ονομάζονται integrons.⁴⁻⁸ Τα integrons αποτελούνται από δύο σταθερές περιοχές (conserved segments, 5'CS, 3'CS), οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν μιας μεταβλητής περιοχής όπου ενσωματώνονται ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά. Συχνότερα είναι τα γονίδια που προσδίδουν αντοχή στην τριμεθοπρίμη και τις αμινογλυκοσίδες, και σπανιότερα παρατηρούνται γονίδια αντοχής στις κινολόνες, γονίδια παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμάσης (ESBL) και γονίδια μεταλλο-β-λακταμάσης (MBL). Επίσης, στην 3'CS περιοχή στα περισσότερα integrons περιλαμβάνεται το γονίδιο *sull*, το οποίο προσδίδει αντοχή στη σουλφαμεθοξαζόλη, το *qacED1* που προσδίδει αντοχή στις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου και μια περιοχή *ORF5* με άγνωστη λειτουργία. Η κλινική σημασία των integrons έγκειται στο γεγονός ότι η παρουσία τους σχετίζεται με ανθεκτικό φαινότυπο, ενώ η διάδοσή τους μεταξύ βακτηρίων είναι ιδιαίτερα ευχερής εξ αιτίας της ενσωμάτωσής τους σε μεταθετά στοιχεία του γονιδιώματος, όπως τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η περιγραφή του επιπολασμού της AB σε διαφορετικούς πληθυσμούς ηλικιωμένων ατόμων, ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής αντοχής στα στελέχη που απομονώνονται από αυτούς τους ασθενείς, καθώς και ο προσδιορισμός της σημασίας της παρουσίας των integrons στα στελέχη *Enterobacteriaceae* που απομονώνονται από άτομα με AB.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Σχεδιασμός της μελέτης – συλλογή δειγμάτων

Για το χρονικό διάστημα από Οκτώβριο 2002 έως Ιούλιο 2003 συλλέχθηκαν ούρα από άτομα ηλικίας >60 ετών, ανεξαρτήτως φύλου. Όλα τα άτομα από τα οποία ελήφθη καλλιέργεια ούρων δεν ανέφεραν κάποιο σύμπτωμα που αφορούσε στο ουροποιητικό και δεν έφεραν ουροκαθετήρα. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν όλα τα άτομα που δεν μπορούσαν να δώσουν κατάλληλο δείγμα ούρων εξ αιτίας άνοιας ή ακράτειας. Δείγμα ελήφθη από άτομα

που διέμεναν στο Γηροκομείο Αθηνών, από άτομα που διέμεναν στην κοινότητα και από νοσηλεύόμενους ασθενείς στην Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συλλογή δειγμάτων από άτομα που διέμεναν στην κοινότητα έγινε στα ΚΑΠΗ Ζωγράφου και Πειραιά. Τα άτομα που προέρχονταν από την κοινότητα θα έπρεπε να μην έχουν πρόσφατη νοσηλεία σε νοσοκομείο κατά τους τελευταίους 3 μήνες ή άλλη επαφή με το σύστημα υγείας.

Μετά από επιμελή καθαρισμό της περιουρηθρικής περιοχής γινόταν συλλογή των πρώτων πρωινών ούρων. Λαμβάνονταν ούρα από τα μέσα της ούρησης σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη. Η συλλογή γινόταν υπό την επίβλεψη του προσωπικού του γηροκομείου ή του νοσοκομείου, όταν αυτό θεωρήθηκε αναγκαίο. Η μεταφορά των δειγμάτων στο μικροβιολογικό εργαστήριο γινόταν εντός 1 ώρας από τη λήψη τους, για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.

Απομόνωση μικροβίων και προσδιορισμός της ευαισθησίας

Η καλλιέργεια ούρων έγινε σε τρυβλία με McConkey και αιματούχο άγαρ. Ως θετική θεωρήθηκε η καλλιέργεια στην οποία παρατηρήθηκε ανάπτυξη ενός είδους μικροβίου σε ποσότητα >10⁵ cfu/mL. Καλλιέργειες στις οποίες αναπτύχθηκαν περισσότερα του ενός μικρόβια ή αναπτύχθηκε μικρόβιο <10⁵ cfu/mL θεωρήθηκαν ως ακατάλληλες. Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας έγινε με τη μέθοδο Kirby-Bauer.

Ανίχνευση γονιδίων παραγωγής ευρέος φάσματος β-λακταμάσης και γονιδίων μεταλλο-β-λακταμάσης

Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν για παραγωγή ESBL με τη δοκιμασία διάχυσης διπλού δίσκου⁹ και για παραγωγή MBL με τη δοκιμασία διπλού δίσκου με τη χρήση δίσκων ιμιπενέμης και ιμιπενέμης-EDTA, όπως έχει περιγραφεί.¹⁰

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση διαλύματος λύσης κυττάρων και πρωτεΐνάσης K. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA ήταν η εξής: Τα μικρόβια ανακαλλιεργούνταν σε McConkey άγαρ για 24 ώρες, συλλέγονταν 3-5 αποικίες από το καλλιέργημα και εναιωρούνταν σε 1,5 mL PBS (phosphate-buffered saline). Μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα διαλυόταν σε 100 μL διαλύματος λύσης κυττάρων (lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA) και στη συνέχεια προστίθετο η πρωτεΐνάση K. Μετά από επώαση στους 37 °C για 3 ώρες, το διάλυμα υποβαλλόταν σε βρασμό για 10 min.

PCR για ανίχνευση της παρουσίας integrons

Μετά από την απομόνωση του DNA από όλα τα στελέχη, διεγερθήκε σε όλα τα δείγματα PCR για την ανίχνευση παρουσίας integrons με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο της ιντεγκράσης 1.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *Int1-F* (5'-TCT CGG GTA ACA TCA AGG-3') και *Int1-R* (5'-AGG AGA TCC GAA GAC CTC-3'), οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα 243 ζευγών βάσεων του γονιδίου.⁷ Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 100 pmoles από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε νουκλεοτίδιο, 1 U Taq πολυμεράσης ανά αντίδραση, PCR buffer 10x και MgCl₂ σε συγκέντρωση 1,5 mM, σε τελικό όγκο 50 μL. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση ήταν οι ακόλουθες: Αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3 min, ακολουθούμενη από 30 κύκλους που αποτελούνταν από αποδιάταξη στους 94 °C για 1 min, υβριδισμό στους 55 °C για 1 min και επέκταση στους 72 °C για 1 min.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης σε TBE (TBE 5x: 0,01 M EDTA pH 8, 0,44 M Trizma-base, 0,44 M boric acid) επί 90 min σε 100 Volts, με βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,4 μg/mL. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 2%. Για τον υπολογισμό του μεγέθους των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκαν κλίμακες DNA με διαβαθμίσεις 100 ζευγών βάσεων.

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v 12.0 για Windows. Η συσχέτιση της αντοχής στα αντιβιοτικά με την παρουσία integrons διενεργήθηκε με το Fisher's exact test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια της μελέτης ελήφθη δείγμα ούρων για καλλιέργεια από 638 άτομα, ηλικίας >60 ετών, 430 (67,4%) άνδρες και 208 (32,6%) γυναίκες. Από τα άτομα αυτά, 323 διέμεναν στην κοινότητα, 186 διέμεναν σε γηροκομείο και 129 νοσηλεύονταν σε παθολογική κλινική. Από τα άτομα που διέμεναν στην κοινότητα, στα 214 η συλλογή των ούρων έγινε σε ΚΑΠΗ. Η μέση ηλικία των ατόμων ήταν 71,08±9,19 έτη, η οποία για τους άνδρες κυμαινόταν στα 73,29±2,05 έτη και για τις γυναίκες στα 68,00±3,35 έτη.

Συνολικά, 137 (21,5%) καλλιέργειες ήταν θετικές, 372 (58,3%) ήταν στείρες και 129 (20,2%) αξιολογήθηκαν ως ακατάλληλες. Θετικές ουροκαλλιέργειες είχαν 44 (13,6%) άτομα από την κοινότητα, 57 (30,6%) ηλικιωμένοι που διέμεναν σε γηροκομείο και 36 (27,9%) νοσηλευόμενοι ασθενείς. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά θετικών ουροκαλλιεργειών στα δύο φύλα. Το μικρόβιο που απομονώθηκε με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν η *E. coli* (51,8%) και ακολούθησαν οι εντερόκοκκοι (18,2%) και ο *P. mirabilis* (15,3%). Τα ποσοστά των απομονωθέντων μικροοργανισμών ανά πληθυσμό της μελέτης παρατίθενται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Απομονωθέντα μικρόβια ανά πληθυσμιακή ομάδα.

Είδος μικροβίου	Κοινότητα n (%)	Γηροκομείο n (%)	Κλινική n (%)
<i>E. coli</i>	18 (41)	35 (61,4)	18 (50)
<i>K. pneumoniae</i>	2 (4,5)	5 (8,8)	2 (5,5)
<i>P. mirabilis</i>	6 (13,6)	10 (17,5)	5 (13,9)
<i>P. aeruginosa</i>	0	1 (1,7)	6 (16,7)
<i>M. morgani</i>	0	1 (1,7)	0
<i>E. cloacae</i>	1 (2,3)	0	0
<i>Staphylococcus spp</i>	1 (2,3)	1 (1,7)	0
<i>Enterococcus spp</i>	16 (36,4)	4 (7)	5 (13,9)
Σύνολο	44	57	36

Αντοχή

Οι ευαισθησίες των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών στα αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται συχνά, περιγράφονται στον πίνακα 2. Συνολικά, τα ποσοστά αντοχής των Gram-αρνητικών ήταν υψηλότερα σε νοσοκομειακού ασθενείς, ενώ για τα Gram-αρνητικά εκτός *E. coli* τα ποσοστά αντοχής ήταν υψηλά τόσο στο γηροκομείο όσο και στο νοσοκομείο. Στα στελέχη εντεροκόκκου δεν παρατηρήθηκε αντοχή στην αμπικιλίνη ή στη βανκομυκίνη.

Παραγωγή ESBL

Στα στελέχη της κοινότητας δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή ESBL. Από τα στελέχη του γηροκομείου, 11 στα 52 παρήγαγαν ESBL (21,1%). Αναλυτικά, ESBL παρήγαγαν 3 στα 35 στελέχη *E. coli* (8,6%), 7 στα 10 στελέχη *Proteus* (70%) και 1 στα 5 στελέχη *Klebsiella* (20%). Τα στελέχη *M. morgani* και *P. aeruginosa* δεν παρήγαγαν ESBL. Από τα στελέχη της κλινικής, παραγωγοί ESBL ήταν 8 στα 31 (25,8%). Συγκεκριμένα, 5 στα 18 στελέχη *E. coli* (27,8%), 1 στα 5 στελέχη *Proteus* (20%), 1 στα 2 στελέχη *Klebsiella* και 1 στα 6 στελέχη *P. aeruginosa* παρήγαγαν ESBL.

Από τα στελέχη του γηροκομείου, φαινοτυπική εικόνα κεφοταξιμάσης είχε ένα στέλεχος *E. coli* και ένα στέλεχος *Proteus*. Από τα νοσοκομειακά στελέχη, φαινότυπος συμβατός με παραγωγή κεφοταξιμάσης παρατηρήθηκε σε 3 στελέχη *E. coli*. Παραγωγή MBL δεν ανιχνεύτηκε σε κάποιο στέλεχος της κοινότητας ή νοσοκομειακό.

Παρουσία integrons

Από τα 103 εντεροβακτηριακά στελέχη, τα 23 (22,3%) περιείχαν integrons (πίν. 3). Τα ποσοστά παρουσίας integron

Πίνακας 2. Ευαισθησίες Gram-αρνητικών μικροοργανισμών σε αντιμικροβιακά ανάλογα με το είδος των μικροβίων και τις πληθυσμιακές ομάδες ασθενών.

Αντιβιοτικά	<i>E. coli</i>			Gram-αρνητικά εκτός <i>E. coli</i>		
	Αριθμός ανθεκτικών/αριθμό μικροβίων (%)			Αριθμός ανθεκτικών/αριθμό μικροβίων (%)		
	Κοινότητα	Γηροκομείο	Κλινική	Κοινότητα	Γηροκομείο	Κλινική
Κοτριμοξαζόλη	5/18 (28)	11/35 (31)	12/18 (67)	1/9 (11)	9/16 (56)*	4/7 (57)*
Σιπροφλοξασίνη	0/18	5/35 (14)	8/18 (44)	0/9	7/17 (41)	7/13 (54)
Νιτροφουραντοΐνη	0/18	4/35 (11)	4/18 (22)	6/9 (67)	9/16 (56)*	5/7 (71)*
Γενταμικίνη	0/18	2/35 (6)	1/18 (5)	1/9 (11)	0/17	5/13 (38)
Αμικασίνη	0/18	2/35 (6)	2/18 (11)	0/9	0/17	3/13 (23)
Αμπικιλίνη	5/18 (28)	12/35 (34)	14/18 (78)	0/9	14/16 (87)*	6/7 (86)*
Κεφοταξίμη	0/18	1/35 (3)	5/18 (28)	0/9	6/16 (37)*	2/7 (29)*
Κεφαζιδίμη	0/18	1/35 (3)	2/18 (11)	0/9	6/17 (35)	3/13 (23)
Κεφοξιτίνη	0/18	1/35 (3)	2/18 (11)	0/9	7/16 (44)*	2/7 (29)*
Τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό	2/18 (11)	3/35 (9)	5/18 (28)	0/9	8/17 (47)	5/13 (38)
Πιπερακιλίνη/ταζοβακτάμη	0/18	0/35	2/18 (11)	0/9	0/17	3/13 (23)
Ιμιπενέμη	0/18	0/35	0/18	0/9	0/17	1/13 (8)
Μεροπενέμη	0/18	0/35	0/18	0/9	0/17	2/13 (16)

* Εκτός *P. aeruginosa***Πίνακας 3.** Επιπολασμός των integrons σε εντεροβακτηριακά στελέχη ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών.

Είδος	Κοινότητα n (%)	Γηροκομείο n (%)	Κλινική n (%)
<i>E. coli</i>	2/18 (11,1%)	6/35 (17,1%)	7/18 (38,8%)
<i>K. pneumoniae</i>	0/2	1/5 (20%)	1/2 (50%)
<i>P. mirabilis</i>	1/6 (16,6%)	5/10 (50%)	1/5 (20%)
<i>M. Morganii</i>		0/1	
<i>E. cloacae</i>	0/1		
Σύνολο	3/27 (11,1%)	12/51 (23,5%)	9/25 (36%)

ήταν χαμηλότερα σε στελέχη από την κοινότητα (11,1%), ενδιάμεσα σε στελέχη από γηροκομείο (23,5%) και μεγαλύτερα σε νοσοκομειακά στελέχη (36%). Η συσχέτιση της παρουσίας integrons με αντοχή στα συχνότερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά φαίνεται στον πίνακα 4. Τα στελέχη που περιείχαν integrons εμφάνιζαν συχνότερα αντοχή στις περισσότερες ομάδες αντιμικροβιακών. Επί πλέον, η παρουσία πολυαντοχής (αντοχής σε περισσότερες από δύο ομάδες αντιμικροβιακών) ήταν σημαντικά συχνότερη σε στελέχη που περιείχαν integrons (70,8% έναντι 8,9%, $p < 0,001$, OR: 24,99, 95% CI: 7,73–80,76). Επίσης, τα στελέχη που περιείχαν integron είχαν συχνότερα και ESBL (50% έναντι 6,3%, $p < 0,001$, OR: 14,8, 95% CI: 4,42–49,56).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη προσδιόρισε τη συχνότητα της AB σε τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς ηλικιωμένων ασθενών, σε ασθενείς που διαμένουν στην κοινότητα, σε τροφίμους γηροκομείων και σε νοσηλευόμενους στο νοσοκομείο. Η συχνότητα ήταν χαμηλότερη στην κοινότητα (13,6%), ενώ ήταν παρόμοια σε τρόφιμους γηροκομείου και σε νοσηλευόμενους ασθενείς (30,6% και 27,9%, αντίστοιχα). Η συχνότητα της AB στους ασθενείς από την κοινότητα είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στις περισσότερες μελέτες.^{2,11,12} Οι ασθενείς που διέμεναν σε γηροκομείο εμφάνισαν παρόμοια συχνότητα θετικών ουροκαλλιεργειών με τους ασθενείς που νοσηλεύονταν σε παθολογική κλινική. Τα υψηλά αυτά ποσοστά, μάλιστα, αφορούσαν σε ασθενείς χωρίς ουροκαθετήρα. Η παρουσία ουροκαθετήρα θεωρείται ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για AB και για συμπτωματική λοίμωξη σε ηλικιωμένους που διαμένουν στο γηροκομείο. Φαίνεται όμως ότι και άλλοι παράγοντες είναι εξ ίσου σημαντικοί σε αυτόν τον πληθυσμό, ενώ η απουσία πρόσφατων επεμβατικών χειρισμών στο ουροποιητικό δεν ελαττώνει κατά πολύ τον κίνδυνο λοίμωξης. Το παρόν εύρημα πιθανόν οφείλεται στην ιδιαίτερα συχνή παρουσία πολλών υποκείμενων νοσημάτων σε ηλικιωμένους ασθενείς στα γηροκομεία, όπως χρόνια νοσήματα του ουρογεννητικού συστήματος (υπερτροφία του προστάτη, ουρολιθίαση, πρόπτωση της μήτρας) και χρόνιες νευροψυχιατρικές νόσοι.

Πίνακας 4. Ποσοστά αντοχής εντεροβακτηριακών ανάλογα με την παρουσία integrons.

Αντιβιοτικό	Αντοχή				p	OR (95% CI)	
	Integron-αρνητικά στελέχη, n (%)		Integron-θετικά στελέχη n (%)				
Αμπικιλίνη	35/79	(44,3)	22/24	(91,7)	<0,001	13,8	(3,0–62,9)
Πιπερακιλίνη	20/79	(25,3)	20/24	(83,3)	<0,001	14,7	(4,5–48,4)
Αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό	16/79	(20,3)	17/24	(70,8)	<0,001	9,6	(3,4–27)
Πιπερακιλίνη/ταζοβακτάμη	3/79	(3,8)	5/24	(20,8)	0,016	6,7	(1,5–30,4)
Κεφουροξίμη	16/79	(20,3)	15/24	(62,5)	<0,001	6,6	(2,4–17,7)
Κεφοξιτίνη	8/79	(10,1)	12/24	(50)	<0,001	8,9	(3–26,2)
Κεφοταξίμη	5/79	(6,3)	12/24	(50)	<0,001	14,8	(4,4–49,6)
Κεφταζιδίμη	4/79	(5,1)	9/24	(37,5)	<0,001	11,2	(3,1–41,3)
Κεφεπίμη	3/79	(3,8)	3/24	(12,5)	0,137	3,6	(0,7–19,3)
Ιμιπενέμη	0/79	(0)	2/24	(8,3)	0,053		
Μεροπενέμη	1/79	(1,3)	1/24	(4,2)	0,413	3,4	(0,2–56,4)
Αζτρεονάμη	2/79	(2,5)	6/24	(25)	0,002	12,8	(2,4–68,9)
Γενταμικίνη	3/79	(3,8)	5/24	(20,8)	0,016	6,7	(1,5–30,4)
Τομπραμυκίνη	5/79	(6,3)	11/24	(45,8)	<0,001	12,5	(3,7–42)
Αμικασίνη	4/79	(5,1)	5/24	(20,8)	0,03	4,9	(1,2–20,2)
Σιπροφλοξασίνη	11/79	(13,9)	16/24	(66,7)	<0,001	12,4	(4,3–35,7)
Κοτριμοξαζόλη	16/79	(20,3)	24/24	(100)	<0,001		
Κολιμυκίνη	25/79	(31,6)	7/24	(29,2)	1,000	0,9	(0,3–2,4)

OR: Λόγος πιθανοτήτων, 95% CI: 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Το συχνότερο μικροβιακό αίτιο AB ήταν, όπως ήταν αναμενόμενο, η *E. coli* και ακολούθησαν σε συχνότητα οι εντερόκοκκοι, ο *P. mirabilis* και η *K. pneumoniae*. Παρόμοιες ήταν οι συχνότητες απομόνωσης όσον αφορά στο είδος των μικροβίων και από τους τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς της μελέτης, με τη διαφορά της απομόνωσης *P. aeruginosa* με μεγαλύτερη συχνότητα στους νοσοκομειακούς ασθενείς και εντερόκοκκου στα άτομα της κοινότητας. Η πρόσφατη νοσηλεία ήταν ένας από τους παράγοντες κινδύνου για AB από *P. aeruginosa* και σε άλλη μελέτη, αν και πιθανόν αυτό να αποδίδεται στην παρουσία ουροκαθετήρα.¹³ Δεν υπάρχουν στοιχεία αναφορικά με την κλινική σημασία της AB που προκαλείται από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Ενδεχομένως, η παρουσία *P. aeruginosa* ή εντερόκοκκου να σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο συμπτωματικής λοίμωξης συγκριτικά με τα εντεροβακτηριακά. Στην προαναφερθείσα μελέτη, ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκε *P. aeruginosa* ή εντερόκοκκος είχαν πιο συχνά AB και σπανιότερα συμπτωματική λοίμωξη συγκριτικά με αυτούς από τους οποίους απομονώθηκε εντεροβακτηριακό.¹³

Η παραγωγή ESBL ήταν συχνή σε στελέχη του γηροκομείου και σε νοσοκομειακά στελέχη (21,1% και 25,8%, αντίστοιχα), ενώ δεν ανιχνεύτηκε παραγωγή ESBL από τα

στελέχη της κοινότητας. Επίσης, δεν ανιχνεύτηκε σε κάποιο στέλεχος παραγωγή MBL. Το εύρημα αυτό ενισχύει την άποψη που έχει διατυπωθεί, ότι τα γηροκομεία αποτελούν πύλη εισόδου των ESBL σε τριτοβάθμια νοσοκομεία.^{14–16} Επί πλέον, ασθενείς που έχουν αποικιστεί ή έχουν υποστεί λοίμωξη στο νοσοκομείο από στέλεχος που παράγει ESBL επιστρέφουν στο γηροκομείο με το εν λόγω στέλεχος και το διασπείρουν.¹⁷ Μια επιδημιολογική μελέτη από τις ΗΠΑ έδειξε ότι ο επιπολασμός στελεχών που παράγουν ESBL σε ένα γηροκομείο ήταν 46%.¹⁸ Οι συγκεκριμένοι ασθενείς είχαν παραμείνει στο γηροκομείο για τουλάχιστον 6 μήνες, χωρίς να μεσολαβήσει νοσηλεία σε τριτοβάθμιο νοσοκομείο.

Στην επιλογή των στελεχών που παράγουν ESBL συμβάλει η χρήση αντιβιοτικών, η οποία είναι ιδιαίτερα συχνή στο περιβάλλον του γηροκομείου, με συνηθέστερη τη χρήση αντιβιοτικών από το στόμα, όπως οι κινολόνες και η κοτριμοξαζόλη, με κύρια ένδειξη τη θεραπεία συμπτωματικών ουρολοιμώξεων ή AB. Σε κάποιες μελέτες ενοχοποιείται η χρήση κεφαλοσπορινών τρίτης γενεάς, ενώ σε άλλες όχι.^{18,19} Σε μια άλλη μελέτη, το 38% των τροφίμων γηροκομείου είχαν λάβει κάποιο αντιβιοτικό τον προηγούμενο μήνα.²⁰ Επί πλέον, ασθενείς σε αυτούς τους χώρους είναι επιρρεπείς στον αποικισμό εξ αιτίας της παρουσίας ουροκαθετήρων ή

εξελκώσεων του δέρματος που προκαλούνται από παρατεταμένη κατάκλιση, ενώ έχει αποδειχθεί ότι στα εν λόγω ιδρύματα δεν τηρούνται σχολαστικά οι κανόνες υγιεινής, όπως το πλύσιμο των χεριών από το προσωπικό, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την κλωνική διασπορά τέτοιων στελεχών.²¹

Αρκετές πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικό ρόλο στη διασπορά γονιδίων αντοχής διαδραματίζουν τα integrons.^{6-8,22} Στην παρούσα μελέτη, το 22,3% των εντεροβακτηριακών στελεχών περιείχε integrons. Τα ποσοστά ήταν μικρότερα για τα στελέχη της κοινότητας (11,1%), ενδιάμεσα για τα στελέχη του γηροκομείου (23,5%) και υψηλότερα για ασθενείς νοσηλευόμενους σε νοσοκομείο (36%). Το εύρημα αυτό αποδεικνύει τη σημασία του γηροκομείου στη διασπορά των integrons και κατ'επέκταση της αντοχής. Επί πλέον, παρατηρείται η παρουσία μιας δεξαμενής στελεχών που περιέχουν integron σε εντεροβακτηριακά στελέχη προερχόμενα από την κοινότητα. Τα συγκεκριμένα άτομα δεν είχαν προηγούμενη νοσηλεία σε νοσοκομείο κατά το παρελθόν χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη στην εμπειρική θεραπεία λοιμώξεων της κοινότητας, όπως οι ουρολοιμώξεις, με δεδομένο ότι τα στελέχη που περιέχουν integrons είναι σχεδόν πάντα ανθεκτικά στην κοτριμοξαζόλη, ενώ συχνά και σε άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των λοιμώξεων της κοινότητας. Σύμφωνα με στοιχεία του WHONET για το 2005, το 26,2% στους άνδρες και το 20,9% στις γυναίκες των στελεχών ούρων *E. coli* από την πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας παρουσίαζε αντοχή στην κοτριμοξαζόλη (www.mednet.gr/whonet).

Εκτός από την κοτριμοξαζόλη, η παρουσία integrons έχει συσχετιστεί με αντοχή και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών. Για παράδειγμα, σε προαναφερθείσα μελέτη, η παρουσία integrons συσχετίστηκε με αντοχή στις αμινογλυκοσίδες εκτός από την αμικασίνη, στις κινολόνες, την αμπικιλίνη,

την τικαρκιλίνη, την πιπερακιλίνη, την πιπερακιλίνη/ταζοβακτάμη, την αζτρεονάμη και την κεφαζιδίμη. Αντίθετα, αυτό δεν παρατηρήθηκε για τις κεφαλοσπορίνες (εκτός από την κεφαζιδίμη), τικαρκιλίνη-κλαβουλανικό, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό και τις καρβαπενέμες.⁵ Σε άλλες μελέτες, παρουσιάστηκε συσχέτιση της παρουσίας integron με περισσότερες ομάδες αντιβιοτικών.^{8,22} Στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκε ισχυρή συσχέτιση των integrons με αντοχή σε όλες τις ομάδες αντιμικροβιακών, με εξαίρεση τις καρβαπενέμες και την κολιμυκίνη. Αντοχή παρατηρήθηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, σε αντιβιοτικά όπως η κοτριμοξαζόλη και οι αμινογλυκοσίδες, έναντι των οποίων τα ανθεκτικά μικρόβια περιέχουν γονίδια αντοχής που υπάρχουν συχνά ως γονιδιακές κασέτες σε integrons, αλλά και σε αντιβιοτικά όπως οι β-λακτάμες και οι κινολόνες, τα γονίδια αντοχής των οποίων σπάνια περιέχονται σε integron. Επί πλέον, τα στελέχη που περιείχαν integron παρήγαν συχνότερα και ESBL. Αυτό το γεγονός οφείλεται στη συχνή εντόπιση των integrons σε μεταθετά στοιχεία, όπως πλασμίδια ή τρανσποζόνια, στα οποία εδράζονται άλλα γονίδια όπως είναι αυτά των ESBL. Επομένως, η παρουσία integrons συνεπάγεται και πολυαντοχή, σύμφωνα με το εύρημα της παρούσας μελέτης.

Συμπερασματικά, η AB είναι ιδιαίτερα συχνή στους ηλικιωμένους, ιδιαίτερα σε νοσηλευόμενους σε τριτοβάθμια νοσοκομεία και σε τρόφιμους γηροκομείων. Τα στελέχη που απομονώνονται από τους συγκεκριμένους πληθυσμούς ασθενών είναι πιο συχνά ανθεκτικά, περιέχουν συχνότερα integrons και παράγουν με μεγαλύτερη συχνότητα ESBL. Ειδικά, η παρουσία integrons είναι ένας δείκτης πολυαντοχής. Τα γηροκομεία αποτελούν δεξαμενή των συγκεκριμένων ανθεκτικών στελεχών, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη στην επιλογή αντιμικροβιακής αγωγής στις περιπτώσεις λοιμώξεων σε ηλικιωμένους ασθενείς που προέρχονται από τέτοιο περιβάλλον.

ABSTRACT

Asymptomatic bacteriuria of the elderly; antimicrobial resistance and the importance of integrons

V. NASTOS, C. KOSMIDIS, M. GRAMMATIKOU, G. PETRIKKOS, G.L. DAIKOS

"G.K. Daikos" Infectious Diseases and Antimicrobial Chemotherapy Research Laboratory, First Department of Propedeutic Medicine, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2011, 28(4):529-536

OBJECTIVE Asymptomatic bacteriuria (AB) is common in the elderly. The aims of this study were to determine the prevalence of AB in the elderly and to characterize the organisms. **METHOD** Urinary cultures were performed on asymptomatic adults aged >60 years from October 2002 to July 2003. Urine specimens were collected from residents of nursing homes, community residents and hospitalized patients. When criteria for AB were met, the isolates were tested for susceptibility. *Enterobacteriaceae* were tested for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and metallo-

β -lactamase (MBL) production, and for the presence of integrons. Statistical analysis was carried out with statistical package for social sciences (SPSS) v 12.0 for Windows. **RESULTS** Urine specimens were collected from 638 patients, with a mean age of 71.08 \pm 9.19 years, of whom 186 were nursing home and 323 community residents, and 129 were hospitalized in a department of internal medicine. The prevalence of AB was 13.6% for the community, 30.6% for nursing-home residents and 27.9% for hospitalized patients. The most common cause of AB was *E. coli* followed by enterococci, *P. mirabilis* and *K. pneumoniae*. ESBL production was detected in 21.1% of nursing-home *Enterobacteriaceae* were isolated from 25.8% of nosocomial isolates while no ESBL-producing organisms were found in the community isolates. None of the examined organisms produced MBL. Integrons were present in 22.3% of *Enterobacteriaceae*; 11.1% in community isolates, 23.5% in nursing-home isolates and 36% in nosocomial isolates. Integron-containing *Enterobacteriaceae* were more often resistant to antimicrobial agents. Multidrug resistant phenotype (70.8% vs 8.9%; $p < 0.001$; OR: 24.99; 95% CI: 7.73–80.76) and ESBL production (50% vs 6.3%; $p < 0.001$; OR: 14.8; 95% CI: 4.42–49.56) were more common in integron-carrying isolates. **CONCLUSIONS** The prevalence of AB in nursing-home residents was similar to that of hospitalized patients. More than 1/5 of *Enterobacteriaceae* in nursing-home residents and hospitalized patients produced ESBLs whereas none of the community isolates produced these enzymes. Integrons were detected in some samples of all the bacterial populations causing AB. The highest rate of integrons was observed in hospital isolates, but there is a reservoir in the community. The presence of integrons was associated with multidrug resistance. Patients with AB in the nursing-home environment should be managed as nosocomial patients.

Key words: Asymptomatic bacteriuria, Integrons, Resistance

Βιβλιογραφία

- NICOLLE LE, BRADLEY S, COLGAN R, RICE JC, SCHAEFFER A, HOOTON TM ET AL. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005, 40:643–654
- NICOLLE LE. Asymptomatic bacteriuria in the elderly. *Infect Dis Clin North Am* 1997, 11:647–662
- DONTAS AS, KASVIKI-CHARVATI P, PAPANAYIOTOU PC, MARKETOS SG. Bacteriuria and survival in old age. *N Engl J Med* 1981, 304:939–943
- STOKES HW, HALL RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: Integrons. *Mol Microbiol* 1989, 3:1669–1683
- MARTINEZ-FREIJO P, FLUIT AC, SCHMITZ FJ, GREK VS, VERHOEF J, JONES ME. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 1998, 42:689–696
- NIJSSEN S, FLORIJN A, TOP J, WILLEMS R, FLUIT A, BONTEN M. Unnoticed spread of integron-carrying *Enterobacteriaceae* in intensive care units. *Clin Infect Dis* 2005, 41:1–9
- LEVERSTEIN-VAN HALL MA, PAAUW A, BOX AT, BLOK HE, VERHOEF J, FLUIT AC. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol* 2002, 40:3038–3040
- DAIKOS GL, KOSMIDIS C, TASSIOS PT, PETRIKKOS G, VASILAKOPOULOU A, PSYCHOGIOU M ET AL. *Enterobacteriaceae* bloodstream infections: Presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51:2366–2372
- DRIEUX L, BROSSIER F, SOUGAKOFF W, JARLIER V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: Review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 2008, 14(Suppl 1):90–103
- PETROPOULOU D, TZANETOU K, SYRIOPOULOU VP, DAIKOS GL, GANTERIS G, MALAMOU-LADA E. Evaluation of imipenem/imipenem+EDTA disk method for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures. *Microb Drug Resist* 2006, 12:39–43
- RODHE N, MÖLSTAD S, ENGLUND L, SVÄRDSUDD K. Asymptomatic bacteriuria in a population of elderly residents living in a community setting: Prevalence, characteristics and associated factors. *Fam Pract* 2006, 23:303–307
- ABRUTYN E, MOSSEY J, LEVISON M, BOSCIA J, PITSAKIS P, KAYE D. Epidemiology of asymptomatic bacteriuria in elderly women. *J Am Geriatr Soc* 1991, 39:388–393
- RAVEH D, ROSENZWEIG I, RUDENSKY B, WIENER-WELLY, YINNON AM. Risk factors for bacteriuria due to *Pseudomonas aeruginosa* or *Enterococcus* spp in patients hospitalized via the emergency department. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006, 25:331–334
- BRADFORD PA, URBAN C, JAISWAL A, MARIANO N, RASMUSSEN BA, PROJAN SJ ET AL. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39:899–905
- OTEO J, NAVARRO C, CERCENADO E, DELGADO-IRIBARREN A, WILHELM I, ORDEN B ET AL. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 2006, 44:2359–2366
- MARCH A, ASCHBACHER R, DHANJI H, LIVERMORE DM, BÖTTCHER A, SLEGHEL F ET AL. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2010,

- 16:934–944
17. BIRD J, BROWNING R, HOBSON RP, MACKENZIE FM, BRAND J, GOULD IM. Multiply-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Failure of spread in community-based elderly care facilities. *J Hosp Infect* 1998, 40:243–247
 18. WIENER J, QUINN JP, BRADFORD PA, GOERING RV, NATHAN C, BUSH K ET AL. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999, 281:517–523
 19. RICE LB, WILLEY SH, PAPANICOLAOU GA, MEDEIROS AA, ELIOPOULOS GM, MOELLERING RC Jr ET AL. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990, 34:2193–2199
 20. SMITH PW, SEIP CW, SCHAEFER SC, BELL-DIXON C. Microbiologic survey of long-term care facilities. *Am J Infect Control* 2000, 28:8–13
 21. ASHRAF MS, HUSSAIN SW, AGARWAL N, ASHRAF S, EL-KASS G, HUSSAIN R ET AL. Hand hygiene in long-term care facilities: A multicenter study of knowledge, attitudes, practices, and barriers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010, 31:758–762
 22. LEVERSTEIN-VAN HALL MA, HE MB, AR TD, PAAUW A, FLUIT AC, VERHOEF J. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 2003, 187:251–259

Corresponding author:

C. Kosmidis, 87 Amarousiou-Chalandriou Ave., GR-152 33 Chalandri, Greece
e-mail: ckosmidis@gmail.com

.....