

# TÜNETMENTES BACTERIURIA 1-ES TÍPUSÚ DIABETESSES GYERMEKEKBEN

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

dr. Rózsai Barnabás



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi kar, Gyermekklinika

2009.

## **I. TÜNETMENTES BACTERIURIA EGÉSZSÉGES ÉS DIABETESES POPULÁCIÓBAN**

A húgyúti infekciók az egyik leggyakoribb bakteriális infekciónak számítanak az egészséges populációban. A nem-komplikált húgyúti infekció főleg fiatal felnőttek nőkben fordul elő és könnyen kezelhető. Alapbetegség esetén a húgyúti infekció komplikált formája jelenik meg, nehezen kezelhető és sokszor rekurál.

Diabetes mellitusban a húgyúti infekciók komplikáltak tekintendők, renalis vagy perirenalis tályogok, emphysematous pyelonephritis és - cystitis, gombás fertőzések és papilla necrosis kialakulásához vezethetnek. A diabetes késői szövődményei is érintik a húgyutakat, atherosclerosis, diabeteses nephro- és neuropathia alakulhat ki, mely hólyagdiszfunkcióban, artéria renalis szűkületben nyilvánulhat meg, továbbá ledált működésű immunrendszer is társulhat a fentiekhez. Bizonyos betegcsoportokban, illetve állapotokban a klinikai tünetekkel nem járó, ám mégis pozitív vizeletleoltást mutató infekciók különös jelentőséggel bírnak, ide tartozik a terhesség, az önkátérezők köre, illetve a diabeteses betegek, az entitás pedig a tünetmentes bakteriuria (ASB).

### **I/1. A tünetmentes bakteriuria definíciója**

Vizelet tenyésztésére alkalmas a megfelelő lemosás után nyert középsugar vizelet, a katéteren vagy suprapubicus hólyagpunkció révén nyert vizeletminta. A napi rutinban az első módszert alkalmazzák. Amennyiben  $10^5$  kolónia formáló egység (CFU)/ml számú baktérium tenyészik ki a vizeletből az 80%-os valószínűséggel jelzi a fertőzést. Ha ez a mennyiség két vizeletmintában is megtalálható a valószínűség 95%-ra emelkedik.

ASB-ről akkor beszélünk, ha fertőtlenítést követő, első reggeli, középsugar vizeletből  $10^5$ /ml feletti csíraszám (ugyanaz a) baktérium tenyészik ki és ehhez nem társul húgyúti infekcióra jellemző panasz (dysuria, gyakori vizelési inger, láz) vagy fizikális lelet (costovertebralis érzékenység, urethritis). Az „Infectious Disease Society of America” ajánlása szerint tünetmentes férfiakban egyetlen pozitív minta is elégséges az ASB diagnosztikájához. Amennyiben a baktériumszám  $10^3$  és  $10^4$ /ml közötti felmerül a kontamináció lehetősége.

### **I/2. Tünetmentes bakteriuria a nem diabeteses populációban**

#### **I/2.1. Prevalencia**

Érett, leány újszülöttekben az ASB prevalenciája kevesebb, mint 1%, fiúknál ennél gyakrabban találunk bakteriuriával (~2%). Amennyiben újszülöttben bakteriuria fordul elő kongenitális malformációk (különösen vesico-urethralis reflux) kizárása miatt további vizsgálatok indokoltak. Csecsemőkor után az ASB előfordulása csökken, kisdedkorban lányok 1%-ban mutatható ki, fiúkban pedig extrém ritka. Iskoláskorban emelkedés figyelhető meg, főleg lányok esetében (2-5%) és ebben a tartományban marad felnőttkorban is. A terhesség időszakában a gyakoriság nem változik, azonban a következményei súlyosak lehetnek. Fiatal férfiakban az ASB gyakorisága 0,01% körüli. Idősekben meglehetősen széles tartományban fordul elő ASB (17-50% nőkben, 6-34% férfiakban).

## **I/2.2. A tünetmentes bakteriuria rizikófaktorai nem diabeteses populációban**

Még az egészséges újszülöttek is immunhiányosnak tekintendők, ezért rizikó csoportba tartoznak a bakteriális infekciók tekintetében. Vesefejlődési rendellenességek esetén szintén nagyobb az esély ASB kialakulására. Fiatal nők esetén a szexuális aktivitás egy újabb rizikófaktor. Idősek között a társuló komorbid állapotok (obstruktív uropathiák, neurogén hólyag, debilitás, inkontinencia) gyakoribbak, melyek hozzájárulhatnak az ASB kialakulásához.

## **I/2.3. Immunológia és tünetmentes bakteriuria**

Amennyiben a kórokozók az uroepithellel érintkeznek citokin felszabadulást generálnak (főleg interleukin-6 (IL-6) és interleukin-8 (IL-8)). Az IL-6 a hő-sokk fehérjék csoportjába tartozik, T, B, endothel, epithel sejtek, makrofágok, fibroblastok termelik. Az IL-8 kisméretű (~8 kDal) citokin, melyet makrofágok endo- és epithel sejtek termelnek és a neutrophil kemotaxisért felelős. Az IL-8 emelkedett szintjét írták le húgyúti infekcióban vagy ASB-ban szenvedők vizeletében, míg kontrollokban nem volt detektálható.

## **I/2.4. Genetikai vizsgálatok és húgyúti infekciók**

Számos adat áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy húgyúti infekcióra való hajlam genetikailag meghatározott. A C-X-C kemokinek két cisztein aminosavat tartalmaznak, melyek nagyfokban konzerváltak. A leukocyták felszínén lévő CXCR-receptor-1 és CXCR-receptor-2 képes az IL-8-at megkötni, előbbi nagy affinitással. Kimutatták, hogy krónikus pyelonephritisben szenvedő gyermekek csökkent CXCR-1 expressziót mutatnak a kontrollokhoz képest. Ezáltal azt feltételezve, hogy veleszületett defektus állhat fenn ebben a betegcsoportban. Az is ismert, hogy akut pyelonephritisben szenvedő gyermekek családjában 15%-ban fordult elő korábban pyelonephritis, míg a kontroll csoportban 3% volt ugyanez az arány. Jelenleg a CXCR-1 öt polimorfizmusa (SNP) ismert, melyet összefüggésbe hoztak húgyúti infekciókkal.

## **I/2.5. A tünetmentes bakteriuria kezelése a nem diabeteses populációban**

A normális húgyúti rendszer esetén, ASB jelenlétekor a vesehegesezés, csökkent vesefunkció és hipertónia kialakulásának esélye extrém alacsony, ezért a kezelés nem indokolt, a spontán gyógyulás bekövetkezésének lehetősége jelentős. Az „IDSA” ajánlása szerint az ASB kezelése nem csökkenti a húgyúti infekciók kialakulásának esélyét és nem védi ki a további bakteriuriás epizódok előfordulását sem. Terhességben az ASB jelenléte viszont 20-30-szoros rizikótényezőt jelent akut pyelonephritis kialakulására jelentősen megnövelve ezek a koraszülés lehetőségét.

## **I/3. Tünetmentes bakteriuria diabetesben**

### **I/3.1. Prevalencia**

Az ASB prevalenciája 9.1-29.3% közötti diabeteses nőkben és 0.7-11.1% diabeteses férfiakban. Összeségében az mondható el, hogy 3-szor gyakrabban fordul elő ASB diabeteses nőkben, mint a kontroll csoportban, azonban férfiakban nincs különbség a két populációban. Diabeteses gyermek esetében csak kevés adat áll rendelkezésünkre, az 1960-as években 1.6-2%-os prevalenciát találtak.

### **I/3.2. Tünetmentes bakteriuria rizikófaktorai diabetesben**

Evidensnek tűnik, hogy a hiperglikémia és a következményes glukózuria optimális körülményeket teremt a húgyutak bakteriális kolonizációjához. Azonban széleskörben elfogadott az a megfigyelés, hogy a diabeteses anyagcserehelyzet minőségét mérő glikált hemoglobin szint (HbA<sub>1C</sub>) nem befolyásolja az ASB kialakulását. Jelenleg csak in vitro vizsgálatok találtak pozitív korrelációt a vizelet glükóz koncentrációja és a baktériumok növekedése között. A diabeteses retinopathia és a microalbuminuria előfordulása úgy tűnik nem fokozza az ASB kialakulásának esélyét, azonban a macroalbuminuria a diabetes típusától független rizikótényező. A diabeteses neuropathia 1-es típusú diabetesben rizikófaktor. Magyar szerzők tünetmentes diabeteses gyermekeknél találtak húgyhólyag diszfunkcióra utaló eltéréseket, melynek következtében fennmaradó vizeletreziduum előmozdíthatja a bakteriális kolonizációt. Vannak arra utaló adatok is, hogy a leukocytá működés is zavart szenved diabetesben.

### **I/3.3. A tünetmentes bakteriuria következményei diabetesben**

A fő kérdés az, vajon az ASB fokozza-e a húgyúti infekció kialakulásának veszélyét, továbbá vezethet-e irreverzibilis vesekárosodáshoz. Az irodalmi adatok szerint a vizelet spontán tisztulása nagy valószínűség szerint várható, ugyanakkor az ASB fokozza a húgyúti infekciók kialakulásának lehetőségét. Az eddigi követéses vizsgálatok azonban sem 1-es, sem 2-es típusú diabetesben nem igazolták az ASB rizikó szerepét hipertóniában és veseelégtelenség kialakulásában.

### **I/3.4. Tünetmentes bakteriuria kezelése diabetesben.**

Szintén a követéses vizsgálatokra támaszkodva azt mondhatjuk, hogy az ASB kezelése egyre kevésbé indokolt. Bár az antibiotikus kezelés elpusztítja a kórokozókat a kezelés időtartam alatt, de nem csökkenti a tünetekkel járó húgyúti infekciók számát. Az amerikai álláspont a kezelés mellett teszi le a voksot, mondván csökken a szimptomatikus epizódok súlyossága, ugyanakkor az európai nézet ezzel nem ért egyet és kétségesnek gondolja az antibiotikus terápia indokoltságát.

## **II. CÉLKITŰZÉSEK**

- A fő célunk az ASB előfordulásának felmérése 1-es típusú diabeteses gyermekekben és fiatalokban.
- Céljaink között szerepelt összehasonlítani a diabeteses bakteriuriás és nem bakteriuriás csoportot antropometriai és metabolikus paraméterek tekintetében.
- Vizsgáltuk az ASB-ban előforduló mikroorganizmusok típusait és értékeltük a különböző szűrő módszereink effektivitását.
- Végül a húgyúti infekciók kialakulásában esetlegesen szerepet játszó immunológiai paramétereket vizsgáltuk 1-es típusú diabetes mellitusban.

## **III. BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK**

Újonnan diagnosztizált diabeteses betegek, ketoacidosis miatt ápolat betegek, ismert húgyúti fejlődési rendellenességgel élő betegek nem vehettek részt a vizsgálatban. A résztvevők között lázas, antibiotikumot szedő, infekció tüneteit mutató egyén nem volt. A helyi etikai bizottság engedélyét követően kezdtük a vizsgálatot.

### **III/1. A beteg és kontroll csoport jellemzése**

#### **III/1.1. A „prevalencia vizsgálat” résztvevőinek jellemzői**

Az ASB prevalenciájának felmérésében 178 (86 fiú) 1-es típusú diabeteses adatait dolgoztuk fel. Átlagéletkoruk a vizelet tenyésztéskor  $15.1 \pm 5.9$  év (range: 4.0-29.4) volt, a betegség tartama  $6.2$  (3.0-10.1) [median (IQR)] év (range: 0.5-25.9).

194 egészséges gyermek szolgált kontroll csoportként [(103 fiú) átlagéletkor:  $14.4 \pm 5.1$  év].

#### **III/1.2. A „vizelet citokin” vizsgálat résztvevőinek jellemzői**

133 1-es típusú diabeteses és 178 egészséges kontroll vett részt ebben a vizsgálatban. A diabeteses csoport 66 fiúból és 67 leányból állt, átlagéletkoruk  $15.6 \pm 5.7$  év, a diabetes tartam  $7.3 \pm 4.7$  év volt. A 178 kontroll egyén (94 fiú) átlagéletkora  $14.1 \pm 4.7$  év volt.

#### **III/1.3. A „CXCR expresszió vizsgálat” résztvevőinek jellemzői**

110 diabeteses gyermek és 54 egészséges kontroll részvételével végeztük a CXCR-1 meghatározást. A diabeteses csoportban 43 fiú és 67 leány volt, átlagéletkoruk  $16.0 \pm 5.3$  év volt  $7.6 \pm 5.5$  év betegségtartammal.

#### **III/1.4. A „szérum IL-8” vizsgálat résztvevőinek jellemzői**

Ez a kohort 79 1-es típusú diabetes betegből (28 fiú) (átlagéletkor:  $15.3 \pm 4.7$  év, betegségtartam:  $7.8 \pm 5.0$  év) és 40 egészséges kontrollból (19 fiú) (átlagéletkor:  $12.7 \pm 5.2$  év) állt.

### **III/2. Vizeletvizsgálatok**

A húgycső lemosása három octemidine-dihydrochloriddal átitatott vattadarabbal történt, reggeli, első, középsugárral ürített vizeletmintából két egymást követő napon vettünk mintát. Ezt követően a vizeletmintákat két részre osztottuk. Az egyik részt azonnal centrifugáltuk (3500 rpm 5 percig), majd a felülúszót  $-70^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk és ott tartottuk az IL-6/IL-8 meghatározásig. Az üledékből a leukocyturia meghatározás történt. A második frakciót  $4^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, a mintanyerést követően 3 órán belül eozin-metilénkék és Colombia vér agar táptalajra oltottuk (Oxoid, UK) baktériumtenyésztés céljából. Az eredményt 24 órán keresztül tartó  $37^{\circ}\text{C}$ -os inkubációt követően olvastuk le.

### **III/3. Definíciók**

Az ASB diagnózisát az IDSA kritériumok alapján állítottuk fel. Leukocyturia detektálása vagy mikroszkópos vizsgálattal ( $>5$  sejt/hpf, 400X nagyítással) vagy tesztsíkkal, leukocyta-észteráz kimutatással (Boehringer, Combur<sup>10</sup>-Test M, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A fentiek közül bármelyik pozitivitása elegendő volt a leukocyturia diagnosztizálásához.

### **III/4. Vizelet citokin meghatározás**

A méréseket a PTE, Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében végeztük, immunszerológiai módszerrel OptEIA Sets (Pharmingen USA) segítségével.

### **III/5. CXCR-1 meghatározás**

Szintén a PTE, Immunológiai és Biotechnológiai Intézete segítette a CXCR-1 meghatározásban. Polymorphoprep segítségével neutrophileket izoláltunk, ezt követően fluorescein-konjugált anti-human IL-8RA (CXCR-1) egér IgG2a monoklonális antitestet használtunk a neutrophilek jelölésére. A mintákat FacsCalibur flow citométeren futtattuk (Becton Dickinson, San Jose, CA) és az átlagos fluoreszcenciát határoztuk meg.

### **III/6. Szérum IL-8 meghatározás**

A szérum IL-8 meghatározása immun-kemilumineszcens analizátor (Immulite, DPC) segítségével történt a PTE, Laboratóriumi Medicina Intézetében.

### **III/7. Egyéb laboratóriumi vizsgálatok és antropometriai mérések**

Az átlagos napi vércukorszintet átlagosan 21 mérés átlagából (range: 8-43) kalkuláltuk, melyet a kórházi ápolás 3 napja során mértünk kézi vércukormérő készülékkel (D Cont Personal, 77 Elektronika, Budapest), a mérési tartománya 1.1-25.5 mmol/l közötti. A glikált hemoglobin meghatározás HPLC-vel (Bio-Rad Laboratories Diagnostic Group, Hercules, California, USA; 4.0-6.3% közötti normál tartománnyal) történt. A vizelet- és vércukor mérés GOD/PAP enzimátikus kolorimetriás módszerrel történt (Reanal Rt., Budapest). Az albuminuria vizsgálata 24 órán keresztül gyűjtött vizeletből történt nephelometriás módszerrel (Tubox Microalbuminuria Assay, Orion Diagnostica, Finland) és a microalbuminuriát diagnosztizáltunk abban az esetben, ha az albuminkiválasztás 30 és 300 mg/nap közötti volt a három meghatározásból legalább kétszer. Az életkor és a diabetes tartam mellett meghatároztuk a betegek BMI-jét, a nemi érés kategóriáit a Tanner stádiumok alapján vettük fel: prepubertális=Tanner I., pubertás=Tanner II.-IV. és postpubertális=Tanner V.

### **III/8. Statisztika**

SPSS for Windows 10.0 statisztikai programcsomagot használtuk adataink kiértékeléséhez (Chicago, USA). Az eloszlás tesztelése Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. A különböző csoportok közti különbséget a Student-féle t teszttel (normális eloszlás), Mann-Whitney teszttel vagy Kruskal-Wallis teszttel (nem-normális eloszlás esetén),  $\chi^2$  teszttel és Fisher exact teszttel (dichotóm eloszlásnál) végeztük, továbbá Pearson vagy Spearman korreláció analízist alkalmaztunk. ROC (receiver operating characteristics) analízist és logisztikus regressziót is használtunk.  $p < 0.05$ -öt tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## **IV. EREDMÉNYEK**

### **IV/1. A tünetmentes bakteriuria prevalenciája 1-es típusú diabetesben**

Az ASB prevalenciája 10.1% (95%CI 5.7-14.5%) volt, ez szignifikánsabban gyakoribb mint a kontroll csoportban [2.6% (95%CI 0.35-4.8%); ( $p=0.003$ ), 1. ábra]. Nem találtunk különbséget az ASB előfordulásában a diabeteses fiúk [9.3% (95%CI 3.2-15.4%)] és lányok között [10.9% (95%CI 4.6-17.2%); ( $p=0.73$ )]. Az ASB prevalencia növekvő tendenciát mutatott 15 év feletti diabetesesekben 14.6% (95%CI 7.0-22.2%), míg 15 év alattiakban 6.3% (95%CI 1.4-11.1%); ( $p=0.064$ ).

## **IV/2. A tünetmentes bakteriuria okai**

### **IV/2.1. Metabolikus paraméterek**

A diabeteses és a kontroll csoport paramétereit az 1. táblázatban hasonlítottuk össze.  $\geq 10\%$  HbA<sub>1C</sub> a multivariáns analízis során az ASB független rizikófaktorának bizonyult (OR: 5.23;  $p=0.002$ ); (2. táblázat).

### **IV/2.2. Immunológiai okok – vizelet interleukinok**

Az IL-6 a 178 kontroll közül 39-ben [21.9% (95%CI 15.8-28.0%)] volt kimutatható, míg a 133 diabeteses betegből 24-ben [18.0% (95%CI 11.5-24.5%)] ( $p=0.41$ ). IL-8 ürítést a 133 diabeteses betegből 63-nál [47.4% (95%CI 38.9-55.9%)] és a 178 kontroll között 49-ben [27.5% (95%CI 20.9-34.1%)] észleltünk ( $p=0.001$ ). Az IL-8 szint magasabb volt a diabeteses csoportban a kontrollhoz képest [ $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-22.3$ ) median (IQR)] vs.  $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-4.5$ );  $p=0.001$  (2. ábra). A vizelet IL-8 koncentráció pozitívan korrelált a bakteriuria mértékével ( $p=0.001$ ).

Az IL-8 medián értéke magasabb volt a bakteriuriás diabetesesek között [70.0 pg/mg creatinine (2.5-474.4)], mint a nem bakteriuriás diabeteseseknél [ $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-12.7$ );  $p=0.001$ ] (3. ábra).

A diabeteses csoportban gyenge, pozitív korrelációt észleltünk a HbA<sub>1C</sub> és az IL-8 között ( $r=0.4$ ;  $p=0.002$ ).

### **IV/2.3. CXCR-receptor-1 expresszió**

A leukocyták felszínén expresszáldó CXCR-1 1-es típusú diabeteses betegekben csökkent fluoreszcens aktivitást mutatott, mint a kontroll csoportban [240.4 (95%CI: 232.2-248.7) vs. 256.1 (95%CI: 246.3-266.0);  $p=0.024$ ] (4. ábra). CXCR-1 expresszió a diabeteses csoportban az életkorral korrelált ( $r=0.22$ ;  $p=0.019$ ).

## **IV/3. Szérum IL-8 szint diabeteses gyermekekben**

A szérum IL-8 koncentrációja diabetesben magasabb volt [ $<5$  pg/ml ( $<5-6.4$  pg/ml)] mint a kontrollokban [ $<5$  pg/ml ( $<5-5.2$  pg/ml);  $p=0.025$ ] (5. ábra). Diabeteses betegeket két csoportra osztottuk, aszerint, hogy detektálható-e a szérumukban IL-8 vagy sem. A két csoport között nem volt különbség az életkor, a BMI, a HbA<sub>1C</sub>, a koleszterin, a triglicerid és a microalbuminuria tekintetében. Azonban azon diabetesesek, akikben az IL-8 kimutatható volt hosszabb ideje voltak cukorbeteg, mint azok, akikben nem volt kimutatható az IL-8 ( $9.2 \pm 5.3$  vs.  $6.5 \pm 4.3$  év;  $p=0.018$ ).

## **IV/4. A kórokozók és a pyuria értékelése**

A diabeteses betegek vizeletéből kitenyésztett kórokozókat a 3. táblázatban tüntettük fel. A leukocyturia a diabeteses betegek 17.9%-ban (95%CI 11.5-24.3%), a kontrollok 7.9%-ban (95%CI 4.1-11.7%) fordult elő ( $p=0.006$ ). Diabeteses betegek között, amennyiben ASB is fennállt a leukocyturia gyakorisága 46.7%-ra emelkedett (95%CI 21.5-71.9%), míg bakteriuria nélkül 14.4% volt (95%CI 8.2-20.5%);  $p=0.002$  (1. táblázat).

#### **IV/5. Szűrővizsgálataink hatékonysága tünetmentes bacteriuriában**

A teljes vizsgált mintában vizsgáltuk a szűrőmódszereink hatékonyságát (4. táblázat). ROC analízis (6. ábra) segítségével meghatároztuk azt az optimális IL-8 küszöb értéket, mely alkalmazásával a legmagasabb szenzitivitást és specificitást érhetünk el, ez 10.2 pg/mg kreatinin értéknek bizonyult.

### **V. DISZKUSSZIÓ**

#### **V/1. A tünetmentes bacteriuria prevalenciája**

Minden ötödik 1-es típusú diabeteses nőnél tünetmentes bacteriuria mutatható ki. A kevés gyermekkorban végzett vizsgálat 1% körüli prevalenciát talált. Saját klinikai vizsgálatunk alapján a diabeteses gyermekek esetében az ASB előfordulása 4-szer gyakrabban, mint egészséges társaiknál. Ennek a diszkrepanciának az oka az lehet, hogy az említett vizsgálatok esetén a két vizeletleoltás között 5-14 nap telt el, míg saját anyagunkban két egymást követő napon történt mintavétel. Azt gondoljuk, hogy a fenti időtartam alatt a baktériumok jelentős része spontán szanálódott.

Érdekes módon a diabeteses leányokban nem fordult elő gyakrabban ASB. Amennyiben csak a 15 év felettieket vizsgáljuk, akkor már látható a női dominancia a prevalencia tekintetében, azonban a kisszámú eset miatt ez nem lett szignifikáns.

Számos, felnőttekben végzett vizsgálat azt találta, hogy a glikémiás kontroll nem befolyásolja a bacteriuria kialakulását. Bár nem volt különbség a HbA<sub>1C</sub> szintben a bacteriuriás és a nem-bacteriuriás diabetesesek között, az extrém rossz cukoranyagcsere helyzet az ASB önálló rizikótényezőjének bizonyult.

Felnőtt diabetesesekben végzett vizsgálatok alapján a perifériás neuropathia, a retinopathia és a macroalbuminuria az ASB rizikófaktora. Mindhárom említett komplikáció ritka gyermekkorban, ennek is betudható, hogy a fenti összefüggéseket nem tudtuk megerősíteni.

#### **V/2. Vizelet interleukinok**

A citokinek számos gyulladási folyamatot mediálnak a legkülönbözőbb kórképekben. Az IL-6, mint hő-sokk fehérje, az IL-8 pedig mint kemotaktikus faktor nem diabeteses betegekben húgyúti infekció esetén a vizeletben emelkedett koncentrációt mutat, felnőtt és gyermekkorban egyaránt. Néhány irodalmi hivatkozás arra utal, hogy felnőtt diabeteses nőkben ASB esetén a vizeletben csökkent citokin ürítés észlelhető az egészségesekhez hasonlóan. Ezt a szervezet csökkent válaszreakciójának tekintve szerepet tulajdonítottak az ASB kialakulásában. Az IL-6 mind a betegek, mind az egészségesek ötödének vizeletében volt csak kimutatható. Ellenben az IL-8 válasz gyakrabban fordult elő diabetesben és a medián érték is magasabb volt az egészségesekhez viszonyítva. Azonban a bacteriuriás diabeteses és kontroll egyének IL-8 ürítése azonos nagyságrendű volt, jelezvén az intakt IL-8 választ gyermekkorban.

#### **V/3. Leukocytá CXCR-1 expresszió és szérumban IL-8**

Kontrollokhoz képest csökkent CXCR-1 expressziót igazoltunk 1-es típusú diabeteses gyermekekben. A CXCR-1 expressziót nem befolyásolták a metabolikus paraméterek, mint a HbA<sub>1C</sub>. Ismert, hogy krónikus pyelonephritisben szenvedő gyermekek esetében, infekciómentes időszakban is csökkent CXCR-1 expresszió



mutatható ki. Ennek következménye lehet a csökkent neutrophil kemotaxis, mely hajlamot jelent a húgyúti infekcióra való fogékonyság kialakulásában.

Meghatároztuk a szérumban IL-8 szintet betegeinkben, mely a CXCR-1 szelektív ligandja. Diabetesben magasabb IL-8 szérumban koncentrációt mértünk, mint a kontroll csoportban és összefüggést találtunk a diabetes tartam és az IL-8 szint között. Ez alapján azt feltételeztük, hogy enyhe fokú inflammatorikus állapot micro- és macrovascularis szövődmények hiányában is fennállhat.

A hiperglikémia befolyásoló hatását tanulmányozták az IL-8 szekrécióra in vitro. Kimutatták, hogy a humán aorta endothel sejtek IL-8 messenger RNS termelődése fokozódott a hiperglikémia hatására, ugyanakkor hasonló jelenséget nem figyeltek meg simaizom szöveten. Bár saját vizsgálatainkban a HbA<sub>1C</sub> és a szérumban IL-8 szint között nem volt összefüggés, feltételezhetjük, hogy az 1-es típusú diabeteses betegeknél relatíve gyakran előforduló hiperglikémiás periódusok – mely változások a HbA<sub>1C</sub> koncentrációban nem mutatkoznak meg – hozzájárulhatnak az emelkedett IL-8 szintekhez.

A diabetesben megfigyelt csökkent CXCR-1 expresszió jelentőségét még nem ismerjük. Egészséges felnőttek izolált neutrophil sejteiben expresszálandó CXCR-1 bakteriális lipopolysacharid (LPS) hatására gyors és tartós down-regulációt mutat in vitro. Ez a receptorszám csökkenés számos kórállapotban megfigyelhető és hozzájárulhat a szervezet csökkent védekezőképességéhez, hasonló pathomechanizmust feltételezünk 1-es típusú diabetesben is.

#### **V/4. Kórokozók és pyuria**

Húgyúti infekcióban a leggyakoribb kórokozó az E. coli, mely az esetek 80-90%-ban fordul elő. Diabeteses betegeinkben az E. coli csupán az esetek negyedében izolálható. Úgy tűnik az ASB és a húgyúti infekciók patogénjei különbözőek, ennek oka az eltérő virulencia faktorokban keresendő. Kimutatták, hogy ASB-t okozó E. coli kevesebb virulencia faktorral rendelkezik, mint a húgyúti infekciót okozók.

Megfigyeléseink alapján ASB-ban a gram-negatív kórokozók csak 38.8%-ban fordultak elő, gram-pozitívak 61.2%-ban. A vizelet IL-8 ürítés hasonló volt a kórokozók között gram festéstől függetlenül, mely azt sugalja, hogy a gram-pozitív baktériumok is képesek az uroepithelt stimulálni és patogénként lehetnek jelen a húgyúti traktusban.

A pyuria előfordulása magasabb volt 1-es típusú diabetesben, mint a kontroll csoportban, a betegek körülbelül felében tapasztaltunk pyuriát. Részben mikroszkópos vizsgálattal, részben leukocytá-észteráz kimutatással történt leukocyturia meghatározást követően kiszámoltuk a módszer szűrővizsgálatként való alkalmazhatóságát, azaz a szenzitivitását, specificitását, pozitív (PPV) és negatív prediktív (NPV) értékét. Megerősítve mások vizsgálati eredményeit a leukocyturia szenzitivitása 50%-nak, PPV pedig 31.7%-nak bizonyult. Melynek alapján ennek szűrése nem elégséges módszer az ASB diagnosztizálására, ezért az IL-8 prediktor szerepét is tanulmányoztuk. ROC analízis segítségével jobb szenzitivitást (70.4%) és hasonló PPV értéket kaptunk, mint a leukocyturia értékelésekor. Az alacsony PPV érték oka lehet, hogy az IL-8 gyorsabban eliminálódik a húgyutakból, mint a fehérvérsejtek.

## **VI. AZ ÚJ MEGFIGYELÉSEK ÖSSZEGZÉSE**

- 1-es típusú diabeteses gyermekekben a tünetmentes bakteriuria előfordulása négyeszerese volt a kontroll csoporténak. Nemi különbséget nem észleltünk. A tartósan rossz cukoranyagcsere helyzet ( $HbA_{1C} \geq 10\%$ ) a bakteriuria önálló rizikó faktorának bizonyult.
- A vizelet citokin hálózat (IL-6 és IL-8) kvantitatív működése normális volt tünetmentes bakteriuriás diabetesesekben.
- Enyhe fokú gyulladásos állapot – melyet az emelkedett szérum IL-8 koncentráció jelez – van jelen 1-es típusú diabeteses gyermekekben, mely a CXCR-1 csökkent expresszióját eredményezheti, ez hozzájárulhat a diabeteses betegekre jellemző, infekciókra való nagyobb hajlam kialakulásához. A CXCR-1 expresszió kinetikájának megismerése és megfigyelésünk pontosabb értelmezése további vizsgálatokat igényel.
- A tünetmentes bakteriuriában előforduló kórokozók spektruma különbözik a húgyúti infekcióban tapasztaltakhoz képest, a gram-pozitív törzsek is nagyobb arányban képviseltetik magukat.
- A vizelet IL-8 és a leukocyturia együtt jó szenzitivitású módszer a tünetmentes bakteriuria szűrésében, azonban a pozitív prediktív értékük alacsony.

## **VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Nagyon köszönöm mentoromnak, Dr. Soltész Gyula professzor Úrnak, hogy mind kísérletes, mind klinikai munkám során mindvégig támogatott és folyamatosan biztatott olyankor is, amikor egy-egy kudarc után kevésbé voltam motivált.

Szeretném megköszönni Dr. Barthó Loránd professzor Úrnak, aki diákkörösként megszerettette velem a kísérletes munkát.

Külön köszönöm Dr. Lányi Évának, Dr. Berki Tímeának és Dr. Kőszegi Tamásnak, hogy a kísérletes munka gyakorlati kivitelezésében segítettek.

Hálás vagyok a Gyermekklinika „Mestyán Gyula” Bel-Endokrin-Diabetes Osztályának orvosainak és nővéreinek, hogy a minta- és adatgyűjtésben segítettek.

Köszönöm Dr. Pótó Lászlónak és Dr. Chris Pattersonnak a statisztikai kérdésekben nyújtott segítségüket.

Végül köszönöm feleségemnek és szüleimnek a szeretetüket, támogatásukat.

# ASYMPTOMATIC BACTERIURIA IN TYPE 1 DIABETIC CHILDREN

**Doctoral Thesis**

Barnabás Rózsai MD



Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Pécs

2009.

## **I. ASYMPTOMATIC BACTERIURIA IN HEALTHY AND DIABETIC POPULATIONS**

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common bacterial infections in the healthy population. Uncomplicated UTIs occur most often in young healthy adult women and are easy to treat. However, in other patients groups, UTIs can have a complicated course, are more difficult to treat and often recur.

UTI is a significant problem in patients with diabetes mellitus because of the multiple effects of this disease on the urinary tract and host immune system. Complicated UTIs associated with diabetes include renal and perirenal abscess, gas-forming infections, such as emphysematous pyelonephritis and emphysematous cystitis, fungal infections and renal papillary necrosis. The chronic consequences of diabetes on the genitourinary system are generalized vascular disease (including renal artery stenosis), diabetic nephropathy, diabetic neuropathy resulting in bladder dysfunction and abnormal function of the immune system. Widespread acceptance and application of the quantitative urine culture identified several patient populations who were clinically asymptomatic but had high prevalence of positive urine cultures. These included pregnant women, individuals with urological abnormalities, patients with indwelling urethral catheters and some diabetic patients. This entity is called asymptomatic bacteriuria (ASB).

### **I/1. Definition of asymptomatic bacteriuria**

Acceptable methods for urine collection include midstream clean-catch, catheterization and suprapubic aspiration. The first method is preferred for routine collection of urine for culture. If there are more than  $10^5$  colony-forming units (CFU)/ml in a clean-catch urine, there is 80% probability that it is true bacteriuria. If two different samples demonstrate the same specimen at least  $10^5$  CFU/ml, the probability increases to 95%.

The term ASB refers to the presence of two consecutive, freshly voided, midstream, morning urine specimen both yielding positive cultures ( $\geq 10^5$  CFU/ml) of the same bacterium, in a patients without urinary symptoms. According to the guideline of Infectious Disease Society of America in asymptomatic men a single isolated specimen in a quantitative count  $\geq 10^5$  CFU/ml is sufficient to diagnose ASB. If the bacterial count is between 10 and  $10^4$ /ml usually contamination is considered in spontaneous voided urine.

### **I/2. Asymptomatic bacteriuria in non-diabetic populations**

#### **I/2.1. Prevalence**

In the healthy population the prevalence of ASB is less than 1% in full-term female neonates. Male neonates are more often affected than females (~2%). The presence of bacteriuria in neonates is an indication for investigation to rule out congenital malformations, especially vesico-ureteral reflux. After infancy the prevalence of ASB decreases mainly in boys and in preschool children it occurs in approximately 1% of girls and ASB is very rare in boys. In school-age girls the prevalence of ASB increases to 2-5% and it remains in this range during adulthood in sexually active women. During pregnancy the occurrence of ASB do not change, but the consequences are

more serious than in non-pregnant women. In young adult men the prevalence of ASB is below 0.01%. In the elderly, the prevalence of bacteriuria ranges from 17 to 50% in women and 6-34% in men.

### **I/2.2. Risk factors of ASB in non-diabetic populations**

All neonates are considered to be immunocompromized, therefore they are at a higher risk to any types of bacterial infections. Renal developmental abnormalities can be discovered in any age-group may predispose to bacteriuria. In non-pregnant young women, ASB is strongly associated with sexual activity. In the elderly, some comorbid conditions appear, such as obstructive uropathies, debility, neurogenic bladder, the use of indwelling catheters and incontinence which can contribute to the development of ASB in this population.

### **I/2.3. Immunology and ASB**

When an invading organism reaches the uroepithelium it induces production of cytokines, especially interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8). IL-6 belongs to the heat shock proteins synthesized by T-cells, B-cells, endothelial cells, fibroblasts, macrophages and epithelial cells and stimulates the liver to produce proteins that are responsible for acute-phase response. IL-8 is a small (~8 kDal) cytokine which is produced by macrophages, endo- and epithelial cells, and it works as an inducer of neutrophil chemotaxis. After bacterial stimulation immunofluorescence staining of the uroepithel was shown by IL-6 and IL-8. IL-8 levels are consistently elevated in the urine of patients with UTI and ASB but they are undetectable in the urine of controls.

### **I/2.4. Genetic studies and ASB/UTI**

There are some evidence that the predisposition for UTI is the genetically determined. C-X-C chemokines are members of four chemokine subfamilies. IL-8 binds to leukocytes by CXC-receptor-1 and -2 expressed almost exclusively on the surface of neutrophils. CXCR-1 selectively binds to IL-8 with high affinity. In children with chronic pyelonephritis CXCR-1 expression was decreased comparing to controls. This finding also suggested a defect of innate host defense mechanism of this subpopulation. It is also known that acute pyelonephritis was present in 15% in the medical history of family members of children with acute pyelonephritis, but only in 3% of relatives of control subjects. There are five known CXCR-1 single nucleotide polymorphisms which are associated with reduced binding of transcription factors and thus resulting in increased susceptibility to UTI.

### **I/2.5. Treatment of ASB in non-diabetic populations**

In subjects with normal urinary tract the possibility of renal scarring, declining renal function and hypertension due to ASB is extremely low, therefore the treatment is not indicated, the chance of spontaneous resolution is high. According to the guideline of the Infectious Disease Society of America (IDSA) the treatment of ASB neither decreases the frequency of UTI nor prevents further episodes of ASB in premenopausal, non-pregnant women. Pregnant women have a 20-30 fold risk for developing pyelonephritis during the last trimester and are more likely to experience premature labour or to deliver a low-birth weight infant.

### **I/3. Asymptomatic bacteriuria in diabetic patients**

#### **I/3.1. Prevalence**

The prevalence of ASB ranges between 9.1-29.3% in diabetic women and between 0.7-11.1% in diabetic men. The majority of investigators have reported approximately a three-fold higher prevalence of ASB among diabetic women than among non-diabetic women, but it seems that the prevalence of ASB in diabetic and non-diabetic men is more or less equal. Only few studies are available in diabetic children. Articles - from the 1960's – reported low prevalences of ASB (1.6-2%).

#### **I/3.2. Risk factors of ASB in diabetes**

It seems evident that hyperglycaemia and subsequent glucosuria present optimal circumstances to bacterial colonisation in the urine and uroepithel. However, it is widely accepted the quality of diabetes control measured by glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) level is not a determinant factor in the prevalence of ASB. There are only *in vitro* experiments which found a positive correlation between the glucose concentration of the urine and the bacterial growth. Diabetic retinopathy and microalbuminuria do not seem to increase the prevalence of ASB. But macroalbuminuria is a risk factor of ASB, independently from the type of diabetes. Neuropathy was found to be a risk factor to ASB in type 1 diabetes. Hungarian authors have showed bladder dysfunction in asymptomatic diabetic children which could lead higher amount of residual urine promoting bacterial colonisation of the urinary tract.

Several workgroups investigated the the potentially diminished functions of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in diabetes.

#### **I/3.3. Consequencies of ASB in diabetic patients**

The main question is whether ASB increases the risk of symptomatic UTI in diabetic patients and therefore contributes to the irreversible deterioration in kidney function? Some data support the possibility of spontaneous resolution of ASB, on the other hand ASB enhances the risk of symptomatic UTI. Neither type 1, nor type 2 diabetic patients with ASB had a higher risk for development of hypertension and there was no deterioration in kidney function.

#### **I/3.4. Treatment of ASB in diabetes**

Parallel with the follow-up studies, the treatment of ASB in diabetic patients seems to be less and less justified. It seems that antibiotic therapy cleared the bacteria during the administration period but did not decrease the numbers of symptomatic episodes. The current approaches to management are different in United States and in Europe. In the US, the treatment is recommended because of the frequency and the severity of provoked symptomatic UTI. European physicians believe that the benefit of treatment is doubtful.

## **II. AIMS**

▪ First of all, we wanted to determine the prevalence of ASB in a large cohort of type 1 diabetic children and young adults and in healthy controls.

- The second goal of our work study was to examine the possible differences in some antropometric and metabolic parameters between diabetic patients with and without ASB.
- The next aim was to identify the types of microorganisms causing ASB in type 1 diabetic patients and to evaluate the usefulness of the routine screening method of ASB.
- Finally, we also wanted to find some immunological factors which could play an important role in the susceptibility to urinary infections in type 1 diabetic children.

### **III. PATIENTS AND METHODS**

Newly diagnosed diabetic children, patients with diabetic ketoacidosis and diabetic patients with known renal developmental abnormality were automatically excluded from the studies, except in the case when the effect of ketoacidosis was tested. None of the participants in the study groups had symptomatic infection or fever or received antibiotic treatment during a month before hospitalization. Informed consent was obtained from all participants and the studies were approved by the local ethics committee.

#### **III/1. Characteristics of patients and controls**

##### **III/1.1. Participants in „Prevalence of ASB” study**

To assess the prevalence of ASB in type 1 diabetes data of 178 (86 males) type 1 diabetic children and young adults were analysed. Their average age at the time of urine culture was  $15.1 \pm 5.9$  years (range: 4.0-29.4) with 6.2 (3.0-10.1) [median (IQR)] years of diabetes duration (range: 0.5-25.9).

194 healthy schoolchildren/young adults were asked to serve as the control group [(103 males) average age:  $14.4 \pm 5.1$  years].

##### **III/1.2. Participants in „Urinary cytokine” study**

133 diabetic children and young adults and 178 healthy schoolchildren/young adults were asked to serve as the control group. The diabetic group consisted of 66 males and 67 females whose average age at the time of urine sampling was  $15.6 \pm 5.7$  years with  $7.3 \pm 4.7$  years of diabetes duration. The average age of the 178 control patients (94 males) was  $14.1 \pm 4.7$  years.

##### **III/1.3. Participants in „CXCR-1 expression” study**

One-hundred and ten type 1 diabetic children participated in the CXCR-1 study and 54 healthy schoolchildren/medical students were asked to serve as controls. The diabetic group consisted of 43 males and 67 females whose average age ( $\pm$  SD) was  $16.0 \pm 5.3$  years with  $7.6 \pm 5.5$  years diabetes duration.

##### **III/1.4. Participants in „Serum IL-8” study**

This study group consisted of 79 type 1 diabetic children (28 males) (age:  $15.3 \pm 4.7$  years with  $7.8 \pm 5.0$  years diabetes duration) and 40 healthy control (19 males) (age:  $12.7 \pm 5.2$ ).

### **III/2. Urine sampling and cultures**

After cleaning the genitalia and perineum of patients with three gauze sponges saturated by octemidine-dihydrochloride, midstream clean voiding morning urine samples were collected on two consecutive days. After voiding of the urine the samples were divided into two parts. The smaller fraction of the urine samples was immediately centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes and the supernatants were frozen and kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until the measurement of urinary IL-6 and IL-8 levels. The remaining urine samples were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until taken to the lab, where the inoculation was carried out by a calibrated loop on eosin-methylene blue and Columbia blood agar plates (Oxoid, UK). The results were read after 24 h incubation on  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **III/3. Definitions**

To diagnose ASB we used the criteria of the Infectious Disease Society of America (IDSA). Leukocyturia was diagnosed by microscope defined leukocyturia as  $>5$  cells/high power field (hpf) at 400X magnification or by the dip-slide method (Boehringer, Combur<sup>10</sup>-Test M, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was also used. Leukocyturia was diagnosed if either the microscopic finding or the dip-slide test was positive.

### **III/4. Measurement of urinary cytokine levels**

The measurements were done in Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs. For immunoserological detection of human IL-6 and IL-8 level in urine samples we used optimized commercial OptEIA Sets (Pharmingen USA).

### **III/5. Measurement of CXCR-1**

The measurements were done in Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs. After neutrophil isolation fluorescein-conjugated anti-human IL-8RA (CXCR-1) mouse IgG2a monoclonal antibody was used for staining. The samples were run on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and the mean CXCR-1 fluorescence was determined.

### **III/6. Measurement of serum interleukin-8**

Serum IL-8 levels were measured with an automated immuno-chemiluminescent analyzer (Immulite, DPC). The measurements were done in Department of Laboratory Medicine, University of Pécs.

### **III/7. Other laboratory assessments**

The daily mean blood glucose level was calculated from an average of 21 measurements (median) (range: 8-43) performed during the hospitalization period of three days by a portable meter using capillary blood (D Cont Personal, 77 Elektronika, Budapest, Hungary), with a measuring capacity between 1.1-25.5 mmol/l. Glycated haemoglobin was measured by HPLC (Bio-Rad Laboratories Diagnostic Group, Hercules, California, USA; with 4.0-6.3% normal range). Measurements of urinary and serum glucose (at the time of urine sample collection) were carried out by GOD/PAP enzymatic colorimetric method (Reanal Rt., Budapest, Hungary). Albumin



excretion was measured in 24 h urine sample by liquid-phase immunoprecipitation assay with nephelometric end-point detection (Tubox Microalbuminuria Assay, Orion Diagnostica, Finland) and microalbuminuria was defined as albumin excretion between 30 and 300 mg/day at least in two of three collection performed during the hospitalization period. Information was documented regarding the age and duration of diabetes and BMI was calculated. Pubertal development was assessed according to Tanner stages: prepubertal=Tanner I., pubertal=Tanner II.-IV. and postpubertal=Tanner V.

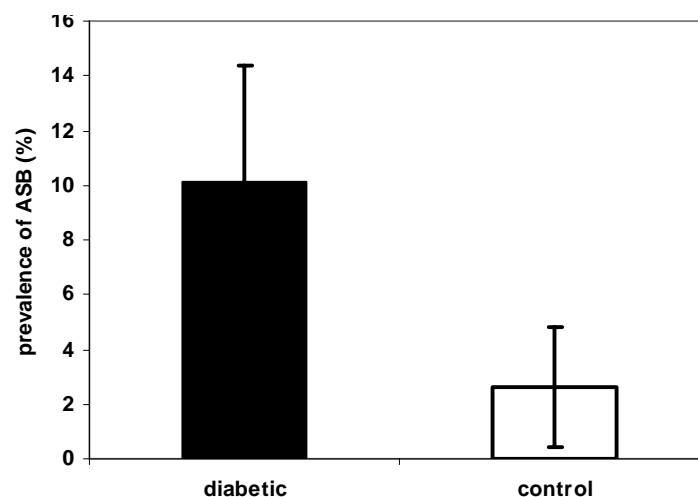
### **III/8. Statistics**

SPSS for Windows 10.0 statistical software was used (Chicago, USA). Distributions of data were tested for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. For assessing statistically significant differences Student's t test (for normal distribution), Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test (for non-normally distributed variables),  $\chi^2$  test and Fisher's exact test (for dichotomous variables) and Pearson or Spearman correlation were used. ROC (receiver operating characteristics) analysis and logistic regression were also used.  $p < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## **IV. RESULTS**

### **IV/1. Prevalence of asymptomatic bacteriuria in type 1 diabetic children**

The prevalence of ASB was 10.1% (95%CI 5.7-14.5%) which was significantly higher in diabetic than in the control group [2.6% (95%CI 0.35-4.8%); ( $p=0.003$ ), Figure 1.]. We did not find any difference in prevalence of ASB between diabetic males [9.3% (95%CI 3.2-15.4%)] and females [10.9% (95%CI 4.6-17.2%); ( $p=0.73$ )].



**Figure 1.:** The prevalence of ASB ( $\pm$  95%CI) in diabetic (black bar) and control children (white bar) ( $p=0.003$ ).

The prevalence of ASB in diabetic patients tended to increase with age  $\geq 15$  years of age [14.6% (95%CI 7.0-22.2%)] vs.  $< 15$  years of age [6.3% (95%CI 1.4-11.1%); ( $p=0.064$ )].

## IV/2. Possible causes of asymptomatic bacteriuria

### IV/2.1. Metabolic parameters

Some parameters were presented in Table 1. HbA<sub>1C</sub> ≥10% in the multivariate analysis proved to be an independent risk factor for ASB (OR: 5.23; p=0.002); (Table 2.).

Parameters	sterile	ASB	P
N	160	18	
Age (yrs)	14.9 ± 5.9	16.9 ± 5.1	0.17
Duration of DM (yrs) *	6.0 (2.9-9.9)	8.5 (5.1-11.9)	0.067
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.9 ± 4.4	22.0 ± 4.6	0.35
Systolic BP (mmHg)	109.6 ± 14.0	111.1 ± 10.0	0.6
Diastolic BP (mmHg)	65.7 ± 7.0	67.8 ± 7.5	0.25
Prepuberty/puberty/postpuberty (%)	23.1/37.5/39.4	16.7/22.2/61.1	0.2
Albumin excretion rate (mg/day) *	11.6 (7.4-20.2)	22.7 (9.6-28.9)	0.054
Daily mean blood glucose (mmol/day)	9.4 ± 2.1	8.6 ± 1.6	0.31
Morning serum glucose (mmol/l)	12.1 ± 4.6	11.3 ± 4.5	0.5
Urine glucose excretion (g/day) *	13.6 (5.5-26.5)	13.0 (4.4-26.8)	0.82
HbA <sub>1C</sub> (%) *	8.3 (7.3-9.8)	10.0 (7.6-11.1)	0.1
<u>Leukocyturia (%)</u>	<u>14.4</u>	<u>46.7</u>	<u>0.002</u>

**Table 1.:** Comparisons between diabetic patients with and without ASB. \*: median (IQR) is given because of the skewed distribution.

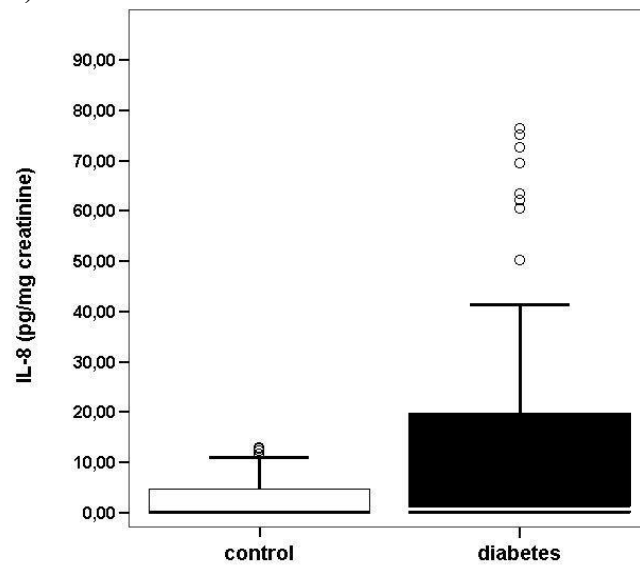
Variables	Univariate		Multivariate	
	p	OR (95%CI)	p	OR adjusted for age (95%CI)
Age	0.17	1.06 (0.98-1.15)	0.85	1.01 (0.89-1.15)
Gender	0.73	1.19 (0.45-3.17)	0.77	1.19 (0.37-3.87)
Duration of DM <5 yrs	0.21	1	0.26	1
5-10 yrs	0.21	2.28 (0.63-8.18)	0.27	2.65 (0.46-15.1)
>10 yrs	0.08	3.17 (0.87-11.5)	0.1	5.2 (0.72-37.1)
Microalbuminuria	0.15	2.47 (0.71-8.54)	0.5	1.58 (0.41-6.04)
<u>HbA<sub>1C</sub> &gt;10%</u>	0.09	2.41 (0.86-6.76)	<u>0.02</u>	<u>5.23 (1.29-21.3)</u>

**Table 2.:** Univariate and multivariate analysis of potential host factors associated with ASB in diabetic patients.

### IV/2.2. Immunological causes – urinary interleukins

IL-6 in the urine was detectable in 39 of 178 controls [21.9% (95%CI 15.8-28.0%)] and in 24 of 133 [18.0% (95%CI 11.5-24.5%)] diabetic patients (p=0.41). Sixty-three of 133 patients with diabetes [47.4% (95%CI 38.9-55.9%)] and only 49 of 178 of

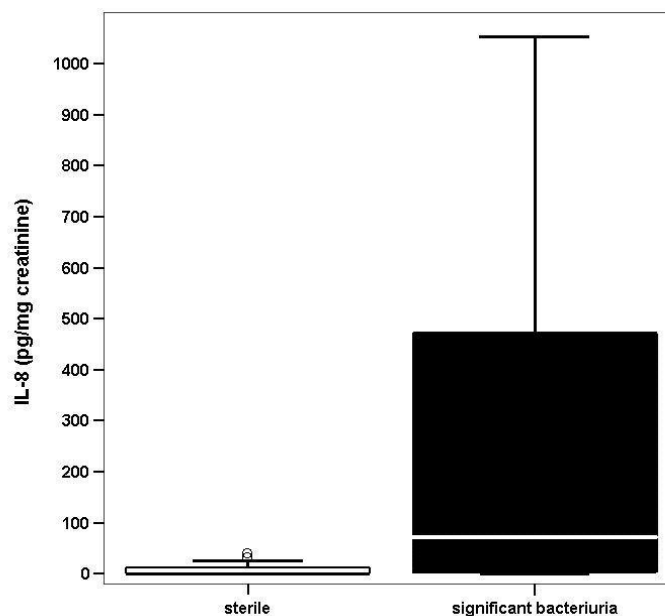
controls [27.5% (95%CI 20.9-34.1%)] had measurable IL-8 in their urine (p=0.001) and IL-8 values were significantly higher in diabetic [ $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-22.3$ ) median (IQR)] than in control patients [ $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-4.5$ ); p=0.001] (Figure 2.).



**Figure 2.:** Urinary IL-8 levels in control (white bar) and diabetic patients (black bar) (p=0.001). Results are presented as boxplot, the horizontal lines inside the bars represent the median, the box represents the IQR. The open circles symbolize the outlier values.

Urinary IL-8 concentration correlated with the level of bacteriuria, the more bacteria in the urine the higher the IL-8 value is (p=0.001).

The median of IL-8 level was higher in diabetics with ASB [70.0 pg/mg creatinine (2.5-474.4)] as compared to those without ASB [ $<3.1$  pg/mg creatinine ( $<3.1-12.7$ ); p=0.001] (Figure 3.).

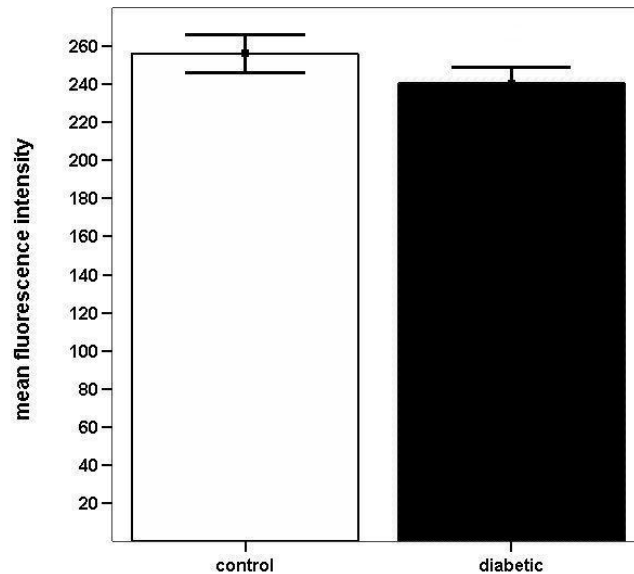


**Figure 3.:** IL-8 levels in diabetic patients with (black bar) and without ASB (white bar) (p=0.001).

In the diabetic group a weak positive correlation was observed between HbA<sub>1C</sub> and detectable IL-8 levels ( $\geq 3.1$  pg/mg creatinine) ( $r=0.4$ ;  $p=0.002$ ).

#### IV/2.3. Expression of CXC-receptor-1

The expression of CXCR-1 on the surface of neutrophils in type 1 diabetic children was significantly lower than that in control group [240.4 (95%CI: 232.2-248.7) vs. 256.1 (95%CI: 246.3-266.0);  $p=0.024$ ] (Figure 4.). CXCR-1 expression in the diabetic group correlated with age ( $r=0.22$ ;  $p=0.019$ ).



**Figure 4.:** The mean fluorescence intensity and 95%CI of CXCR-1 are represented in control (white bar) and in diabetic groups (black bar) (Student's t test;  $p=0.024$ ).

#### IV/3. Serum level of interleukin-8 in type 1 diabetic children

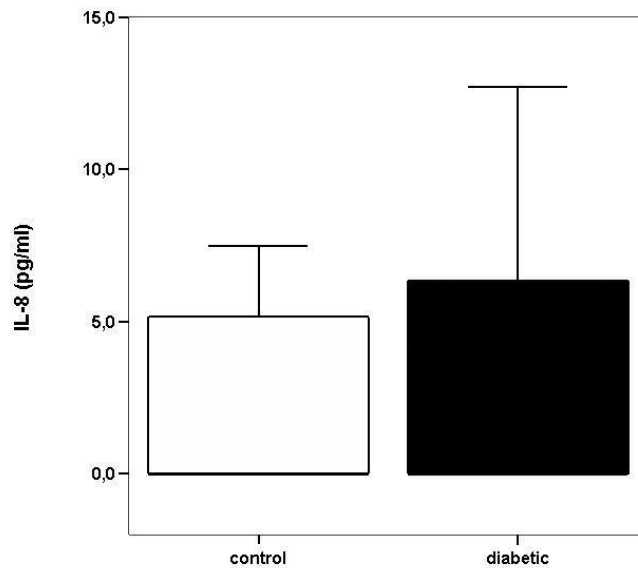
The concentration of IL-8 was higher in diabetic children [ $< 5$  pg/ml ( $< 5-6.4$  pg/ml)] than in control group [ $< 5$  pg/ml ( $< 5-5.2$  pg/ml);  $p=0.025$ ] (Figure 5.). In the diabetic patients there was no difference between age, BMI, HbA<sub>1C</sub>, cholesterol or triglyceride levels and microalbuminuria in the subgroups with detectable and non-detectable IL-8 levels. Diabetic patients with detectable IL-8 level had longer diabetes duration ( $9.2 \pm 5.3$  years), than those without detectable IL-8 levels ( $6.5 \pm 4.3$  years;  $p=0.018$ ).

#### IV/4. Bacterial specimens and evaluation of pyuria

Bacteria cultured in the diabetic group are listed in Table 3.

Bacteria	Gram-staining	Case/ $\Sigma$ n	Leukocyturia/cases
S. agalactiae	positive	6/18	2/6
Enterococcus sp.	positive	5/18	0/5
E. coli	negative	4/18	4/4
K. pneumoniae	negative	3/18	2/3

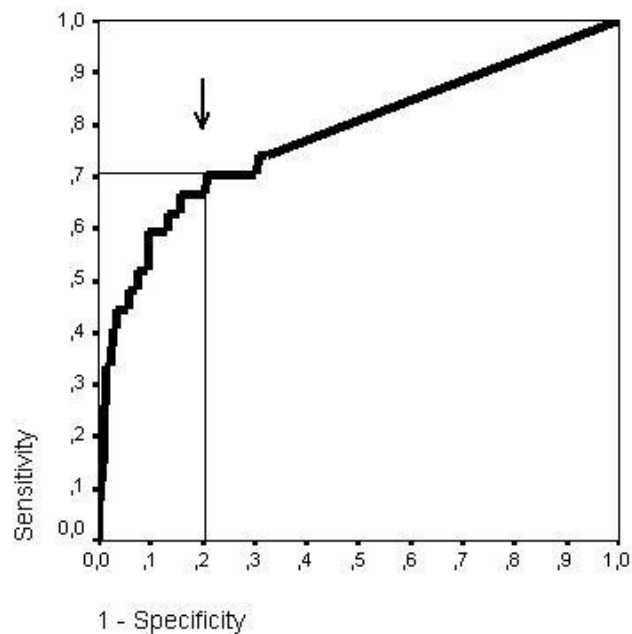
**Table 3.:** Frequency of isolated bacteria and leukocyturia among diabetic patients with ASB.



**Figure 5.:** The serum IL-8 concentrations in control (white bar) and diabetic children (black bar) are represented as a boxplot. (Mann-Whitney test,  $p=0.025$ ).

#### **IV/5. Usefulness of leukocyturia and urinary IL-8 in screening for ASB**

In the whole population the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of leukocyturia - to diagnose ASB - were showed in Table 4. We estimated the optimal cut-off point of urinary IL-8 level for the prediction of ASB by ROC analysis (Figure 6.). Using this method the optimal cut-off point of was an IL-8 level of 10.2 pg/mg creatinine. If this value would be used for screening, the sensitivity, specificity, PPV and NPV were presented in Table 4.



**Figure 6.:** Analysis of the optimal cut-off point of IL-8 for screening ASB by ROC analysis. Arrow shows the value of 10.2 pg/mg creatinine IL-8, the narrow lines are interpolated to the x and y axes to show the sensitivity (70.4%) and the specificity (78.9%).

	<b>leukocyturia</b>	<b>IL-8</b>	<b>leukocyturia+IL-8</b>
Sensitivity (%)	50.0	70.4	81.5
Specificity (%)	89.9	78.9	71.8
PPV (%)	31.7	23.8	21.6
NPV (%)	95.1	96.5	97.6

**Table 4.:** The effectiveness of screening methods of ASB. In the case of IL-8 the value of 10.2 pg/mg creatinine (calculated by ROC analysis) was used as cut-off point.

## **V. DISCUSSION**

### **V/1. Prevalence of ASB**

One out of five type 1 diabetic women had ASB. In the few studies in diabetic children a low prevalence of about 1% was found. We have found that the prevalence of ASB was four-fold higher in diabetic children and young adults as compared controls. One possible explanation for the discrepancy between the published prevalence and the one we have found could be that urine sampling was different in these studies. In these publications, there was an interval of 5 to 14 days between the two urine samplings. Whereas in our study urine was collected on two consecutive mornings.

The prevalence was higher in both diabetic boys and girls, we could not observe the gender difference of ASB (female preponderance), a phenomenon frequency seen in diabetic adults. However, above 15 years of age the prevalence of ASB was higher in diabetic girls, than in boys, but this difference was not statistically significant probably because of the fewer count of subjects.

Several studies in adult diabetic women have shown that the glycemic control did not influence the prevalence of ASB. Our observation suggests that higher HbA<sub>1C</sub> levels tend to promote ASB. Comparing diabetic patients with and without ASB we did not find differences in HbA<sub>1C</sub> levels, but using multiple regression analysis a HbA<sub>1C</sub> levels above 10% (equivalent to the 75 percentile in this study) did increase the risk of the development of ASB.

It was suggested that peripheral neuropathy, retinopathy and macroalbuminuria are significant risk factors for ASB in adult type 1 diabetic women. All three of these conditions are rare in childhood diabetes because of the relatively short duration of diabetes.

### **V/2. Urinary interleukins**

Cytokines play a major role in mediating the inflammatory process in various clinical entities. IL-6 as a heat-shock protein and IL-8 as the main chemoattractant have been found in increased concentrations in the urine of non-diabetic patients with UTI (including ASB) not only in adults, but also in children. However, in a study, lower proinflammatory cytokine secretion were found in the urine of adult diabetic women with ASB compared to healthy women with ASB. An impaired host defense

mechanisms – suggested by these findings - were thought to play an important role in the higher susceptibility to ASB in diabetic patients.

IL-6 was detectable in the urine of only one fifth of both diabetic and control children in our study and in diabetes the urinary IL-6 concentration was similar to those of non-diabetic controls.

However, the IL-8 response was more frequent in diabetic patients than in controls and the median value of IL-8 was also higher in the diabetic subjects. Diabetic patients and controls with ASB, however, had similar IL-8 levels suggesting that the host defense mechanisms associated with urinary interleukins was not diminished in type 1 diabetic children and young adults.

### **V/3. Leukocyte CXCR-1 expression and serum IL-8 concentrations**

We have demonstrated a decreased CXCR-1 expression on the neutrophils of children and young adults with type 1 diabetes as compared to healthy controls. It seemed that the expression of CXCR-1 was not influenced by metabolic parameters, including HbA<sub>1C</sub>, but correlated with age and duration of diabetes. Neutrophils of children with recurrent pyelonephritis in an infection-free period and demonstrated a decreased CXCR-1 expression. The decreased CXCR-1 expression could lead to diminished neutrophil function and could be one possible factor in the susceptibility to infections in diabetes.

In an attempt to find a possible explanation for the lower CXCR-1 expression in diabetes we studied the serum concentration of the selective ligand of CXCR-1, namely IL-8. Higher IL-8 level was found in diabetic children than healthy controls. We have also observed an association between diabetes duration and IL-8 levels, supporting the hypothesis, that there is a low grade inflammation in diabetic patients even in the absence of micro- or macrovascular complications.

The effect of hyperglycaemia on IL-8 secretion was investigated in the *in vitro* study. They have shown an enhanced IL-8 messenger RNA production by human aortic endothelial cells, but not by smooth muscle cells as a response to increasing glucose concentrations. In our study, HbA<sub>1C</sub> did not seem to influence the serum IL-8 levels in diabetes. However, short hyperglycaemic periods - which are often found in type 1 diabetic children and not necessarily reflected in HbA<sub>1C</sub> levels - may have contributed to the elevated IL-8 concentration.

The significance of the lower CXCR-1 expression in type 1 diabetic children is not yet known. Neutrophils of healthy subjects stimulated by bacterial antigens *in vitro*, especially by lipopolysaccharide (LPS) have shown a quick and sustained down-modulation of CXC-receptors within a few minutes after adding the stimulant. The down-regulation of CXC-receptors were studied in many pathological circumstances and the down-modulation of CXC-receptors were prominent contributing to the depressed host defense mechanisms.

### **V/4.Types of bacteria in the urine and lekocyturia**

In UTI the most common bacterium is usually E. coli, which was isolated in about 80-90% of positive cultures. In our diabetic patients with ASB E. coli was found in only about a quarter of positive cases. It seems therefore, that the spectrum of pathogenic bacteria causing ASB and UTI is different. This may be due to the different

virulence factors in ASB and UTI. *E. coli* strains causing ASB had fewer virulence factors than those causing UTI.

According to our observation gram-negative bacteria were present in only 38.8% and gram-positive species in 61.2% of the cases. The IL-8 levels were similar in urines with gram-negative and positive bacteria also suggesting that gram-positive bacteria in the urine of a diabetic patient can induce secretion of interleukines by stimulation of the uroepithelial cells. Therefore, we can assume that gram-positive bacteria can also be pathogenic in the urinary tract.

The frequency of leukocyturia was also higher in diabetic children than in controls. Nearly half of our bacteriuric diabetic patients had leukocyturia. To estimate the sensitivity, specificity, PPV and NPV of leukocyturia we combined the microscopic findings and the dip-slide test (leukocyte-esterase). In accordance with others using leukocyte-esterase test a sensitivity of 50.0% and a PPV of 31.7% was reached. A sensitivity and PPV of this magnitude is not sufficient to reliably identify diabetic patients with ASB. Therefore we also examined the urinary IL-8 as a possible predictor of ASB in diabetes. By means of ROC analysis we have reached a much better sensitivity (70.4%) for IL-8, but similar PPV as in the case of leukocyturia, similarly to other studies. The cause of the lower PPV could be explained by its earlier release from the site of infection, earlier disappearing from the urine than PMNs or bacteria or inflammation elsewhere in the body.

## **VI. SUMMARY OF NEW OBSERVATIONS**

- We have found that the prevalence of ASB is four-fold higher in diabetic children and young adults than in controls. Gender difference is not remarkable. Poor glycemic control ( $HbA_{1C} \geq 10\%$ ) appears to be a significant risk factor.
- There is no impairment in urinary cytokine network (including IL-6 and IL-8) in diabetic children with ASB.
- Low grade inflammatory state – presented by elevated serum IL-8 concentration - in type 1 diabetes may cause down-regulation of CXCR-1, therefore it could contribute to the enhanced susceptibility to several infections in diabetic patients. Further investigations are needed to reveal the kinetics of CXCR-1 expression and understand the clinical importance of this observation.
- The spectrum of pathogenic bacteria in ASB differs from the usual spectrum of UTI, not only gram negative but gram positive strains are also present.
- Urinary IL-8 together with determination of leukocyturia had good sensitivity to screen ASB, unfortunately the positive predictive values of these methods are low.

## **VII. ACKNOWLEDGMENTS**

I am extremely grateful to Professor Gyula Soltész who supported me throughout all my experimental and clinical work. I thank him her never-ending encourage to perform the studies and write my thesis.

I would like to express my gratitude to Professor Loránd Barthó who introduced me to the world of the basic sciences during my undergraduate research in Department of Pharmacology and Pharmacotherapy.

Special thank to Éva Lányi, Tímea Berki and Tamás Kőszegi for their efforts to help me in experimental studies.



We are indebted to the doctors and nurses of the Diabetes and Endocrinology Ward of my workplace for their help in data and specimens collections

We thank László Pótó and Chris Patterson for statistical advice.

I would not have been able to carry out my theses without the love and continuous support of my wife. I would like to thank my parents for helping me during my life.

## **X. PUBLICATIONS AND LECTURES**

### **Publications, abstracts, lectures and posters on which the thesis was based**

#### ***Publications***

- Rózsai B., Lányi É., Soltész Gy.: Asymptomatic bacteriuria and leukocyturia in type 1 diabetic children and young adults. *Diab Care* 26: 2209-2210, 2003. **IF: 7.5**
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Urinary cytokine response to asymptomatic bacteriuria in type 1 diabetic children and young adults. *Pediatr Diab* 7: 153-158, 2006. **IF: 2.162**
- Rózsai B., Lányi É., Soltész Gy.: Tünetmentes bakteriuria 1-es típusú diabeteses gyermekekben – ellenség a kapuknál? *Magyar Orvos* 15: 33-35, 2007.

#### ***Abstracts***

- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Asymptomatic bacteriuria and leukocyturia in type 1 diabetic children and young adults. *Diabetes & Metabolism* 29: 4S208, 2003. **IF: 1.1**
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Decreased expression of CXC-receptor-1 on neutrophils of type 1 diabetic children. *Diabetic Medicine* 23 (Suppl 4): 662, 2006. **IF: 2.484**

#### ***Lectures and posters***

- Rózsai B., Lányi É., Soltész Gy.: Asymptomatic bacteriuria diabeteses gyermekekben és fiatalokban. MGyT és MDT XIX. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Dobogókő, 2002. okt. 25-26.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Asymptomatic bacteriuria and leukocyturia in type 1 diabetic children and young adults. 18<sup>th</sup> IDF, Párizs, 2003. aug. 24-29.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Interleukinok tünetmentes bakteriuriás diabeteses gyermekek vizeletében. MGyT és MDT XX. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Szeged, 2003. okt. 17-18.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Bacteriuria és diabetes – a szűrési módszerek hatékonysága. MGyT és MDT XXI. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Tengelic, 2004. okt. 1-2.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Csökkent CXCR-1 expresszió 1-es típusú diabetesben. MGyT és MDT XXII. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Székesfehérvár, 2005. okt. 7-8.
- Rózsai B., Lányi É., Kőszegi T., Soltész Gy.: Az interleukin-8 lehetséges szerepe 1-es típusú diabetesben. MGyT és MDT XXIII. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Gyula, 2006. szept. 22-23.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Soltész Gy.: Decreased expression of CXC-receptor-1 on neutrophils of type 1 diabetic children. 19<sup>th</sup> IDF, Cape Town, 2006. dec. 3-7.
- Rózsai B., Lányi É., Berki T., Pálkás L., Soltész Gy.: Bacterialis lipopolysacharid hatása CXC-receptorok expressziójára diabetesben. MGyT és MDT XXIV. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Kőszeg, 2007. okt. 26-27.

#### **Other publications and abstracts in diabetes**

- Rózsai B., Soltész Gy.: Glikált haemoglobin diabeteses gyermekekben és fiatalokban. Tükrözi-e a korábbi hosszútávú anyagcserehelyzetet egy random HbA<sub>1C</sub> mérés? *Diabetol Hung* 9 (1): 19-22, 2001.
- Soltész Gy., Rózsai B. Comments to: Tarnow L, Kjeld T, Knudsen E et al. (2000) Lack of synergism between long-term poor glycaemic control and three gene polymorphisms of the renin angiotensin system on risk of developing diabetic nephropathy in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 43: 794-799. *Diabetol* 44 (4): 520, 2001. **IF: 6.299**
- Rózsai B., Soltész Gy.: Thyreoidea autoimmunitás diabeteses gyermekekben. *Gyermekgyógyászat* 52: 342-349, 2001.
- Rózsai B., Kozári A., Hermann R., Soltész Gy.: Associated autoimmunity in type 1 diabetic children. *J Pediatr End Metab* 15 (Suppl 4): 1067, 2002. **IF: 1.146**
- Šumník Z., Schober E., Bratanic N., Lebl J., Rózsai B., Limbert C., Pašková M., Cinek O: Thyroid autoimmunity in children with coexisting type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *J Pediatr End Metab* 16 (Suppl 4): 954, 2003. **IF: 0.947**

- Šumnik Z., Cinek O., Rami B., Kordonouri O., Bratanic N., Danne T., Bittner C., Rózsai B., Lebl J., Soltész Gy., Battelino T., Schober E: HLA-DQ2 and TNF-alpha promoter G308A are associated with increased risk of celiac disease in type 1 diabetic children. *Diabetes* 54 (Suppl 1): 32, 2005. **IF: 8.028**
- Šumnik Z., Cinek O., Rami B., Kordonouri O., Bratanic N., Danne T., Bittner C., Rózsai B., Madácsy L., Lebl J., Limbert C., Paskova M., Soltész Gy., Battelino T., Schober E: HLA-DQ2 and TNF-alpha promoter G308A are associated with increased risk of celiac disease in type 1 diabetic children. *Pediatr Diab* 6 (Suppl. 3.): 11-12, 2005.
- Šumnik Z., Cinek O., Bratanic N., Kordonouri O., Kulich M., Rózsai B., Arató A., Lebl J., Soltész G., Danne T., Battelino T., Schober E.: The risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1\*02-DQA1\*05 and TNF-alpha -308A. *Diab Care* 29: 858-863, 2006. **IF: 7.912**
- Šumnik Z., Cinek O., Bratanic N., Lebl J., Rózsai B., Limbert C., Paskova M., Schober E.: Thyroid autoimmunity in children with coexisting type 1 diabetes mellitus and celiac disease: a multicenter study. *J Pediatr End Metab* 19: 517-522, 2006. **IF: 0.811**
- Molnár E., Rózsai B., Lányi É., Kozári A., Soltész Gy., Kállai J.: Predictors of quality of life and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes: the role of self-directedness and alexithymia. *Ann Behavior Med* 35 (Suppl 1): 153, 2008. **IF: 3.176**
- Rózsai B., Molnár E., Lányi É., Kozári A., Soltész Gy., Kállai J.: Psychoneuroendocrine and psychosocial variables related to gender: association between internalizing behavior problems, distress and salivary cortisol levels in girls with type-1 diabetes. *Ann Behavior Med* 35 (Suppl 1): 127, 2008. **IF: 3.176**

#### Other lectures in diabetes

- Rózsai B., Kozári A., Hermann R., Soltész Gy.: Thyroid autoimmunity in diabetic children. Middle European Workshop of Pediatric Endocrinology (MEWPE), Bled, 2001. nov. 16-18.
- Baranyai D., Kozári A., Rózsai B., Soltész Gy.: Gluténmentes diéta bevezetésének hatása coeliacával társult 1-es típusú diabeteses gyermekekben. MGyT és MDT XX. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Szeged, 2003. okt. 17-18.
- Molnár E., Kozári A., Rózsai B., Soltész Gy., Kállai J.: Gyermekkori diabetes a szülők szemszögéből: Elképzelések a betegségről, a gyermekek viszonyulásáról. MGyT és MDT XXIII. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Gyula, 2006. szept. 22-23.
- Stomfai S., Rózsai B., Kozári A., Soltész Gy.: Egy „elfelejtett” szövödmény 1-es típusú diabetesben. MGyT és MDT XXIV. Gyermekdiabetes Szekció Tudományos Ülése, Kőszeg, 2007. okt. 26-27.

#### Other publications, abstracts

- Rózsai B., Lázár Zs., Benkó R., Barthó L.: Inhibition of the nanc relaxation of the guinea-pig proximal colon longitudinal muscle by the purinoceptor antagonist PPADS, inhibition of nitric oxide synthase, but not by a PACAP/VIP antagonist. *Pharmacol Res* 43 (1): 83-87, 2001. **IF: 0.863**
- Rózsai B., Kozári A., Hermann R., Soltész Gy.: Csökkent glükóz tolerancia Turner -syndromás gyermekekben. *Gyermekgyógyászat* 53: 31-35, 2002.
- Tárnok A., Mosdósi B., Berkó T., Rózsai B., Stankovics J.: Interleukin-2 receptor alpha-subunit deficiency and spontaneous perforation secondary to cytomegalovirus (CMV) colitis. *Z Gastroenterol* 44: 144, 2006. **IF: 1.293**
- Till Á., Rózsai B., Kovács N., Storcz J., Somogyvári F., Deák J., Ertl T., Decsi T.: Első tapasztalataink az újszülöttkori cytomegalovirus-fertőzés ganciclovir kezelésével. *Orv Hetil* 147: 609-613, 2006.
- Rózsai B., Szász M., Ottóffy G., Mohay G., Major A., Adamovich K.: A neonate with an abdominal mass. *Acta Paediatr* 95: 1323-24 discussion: 1327-28, 2006. **IF: 1.297**
- Rózsai B., Horváth M., Savanya M., Környei M., Oprea V., Kárteszi J.: Infective endocarditis with hypocalcaemia and facial dymorphism in an adolescent girl. *Acta Paediatr* 96: 459-460, 2007. **IF: 1.411**
- Rózsai B., Kiss Á., Csábi Gy., Czákó M., Decsi T.: Severe dystrophy in DiGeorge syndrome. *World J Gastroenterol* 15: 1391-1393, 2009. **IF: 2.081**

**Cummulative impact factor: 51.68**