

EVALUAREA REZISTENȚEI LA ANTIBIOTICE A GERMENILOR UROPATOGENI LA PACIENȚI SPITALIZAȚI

EVALUATION OF THE RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF UROPATHOGENIC GERMS IN HOSPITALIZED PATIENTS

Mihaela Elena Idomir

Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania Brașov

Autor corespondent: *Mihaela Elena Idomir*, email midomir@yahoo.com

Abstract

Aim: Urinary tract infections register worldwide high morbidity figures with significant social and economic impact. The aim of the study was to evaluate the etiological spectrum of urinary tract infections in hospitalized patients, to analyze the patterns of antibiotic resistance and the weights of particular phenotypes.

Method: The inoculation of urine samples was done using the calibrated loop method. Difusimetric antibiograms were performed, using the Kirby-Bauer method, the results being interpreted according to CLSI standards.

Results: The most frequently involved were *E. coli* (59.82%), *Klebsiella* spp. (16.35%), *Enterococcus* spp. (12.33%), and *Proteus* spp. (6.74%). *E. coli* recorded higher levels of resistance to ampicillin (59.97%), nalidixic acid (27.83%), norfloxacin (25.31%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (24.69%). *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. had varying degrees of antibiotic resistance, with high sensitivity to carbapenems. *Pseudomonas aeruginosa* had relatively high resistance to antibiotics, including imipenem and meropenem. *Enterococcus* spp. had relatively high weights of resistance to fluoroquinolones and beta-lactams, with high sensitivity to linezolid (99.33%), teicoplanin (95.95%) and vancomycin (93.24%).

Conclusion: The retrospective study reveals the importance of monitoring resistant phenotypes to limit therapeutic failure.

Rezumat

Scop: Infecțiile urinare înregistrează în toată lumea cifre înalte de morbiditate având impact social și economic important. Scopul studiului a fost evaluarea spectrului etiologic al infecțiilor urinare la pacienții spitalizați, analizarea pattern-urilor de rezistență la antibiotice și a ponderilor unor fenotipuri particulare.

Metodă: Pentru însămânțarea probelor de urină a fost utilizată metoda anselor calibrate. Antibiogramele au fost efectuate difuzimetric, prin metoda Kirby-Bauer, rezultatele fiind interpretate conform standardelor CLSI.

Rezultate: Mai frecvent implicați au fost *E. coli* (59,82%), *Klebsiella* spp. (16,35%), *Enterococcus* spp. (12,33%) și *Proteus* spp. (6,74%). *E. coli* a înregistrat niveluri mai ridicate de rezistență la ampicilină (59,97%), acid nalidixic (27,83%), norfloxacin (25,31%) și trimetoprim-sulfametoxazol (24,69%). *Klebsiella* spp. și *Proteus* spp. au avut grade variate de rezistență la antibiotice, sensibilitatea fiind înaltă la carbapeneme. *P. aeruginosa* a avut rezistență relativ crescută la antibiotice, inclusiv la imipenem și meropenem. *Enterococcus* spp. au avut ponderi relativ ridicate de rezistență la fluorochinolone și beta-lactamine, sensibilitatea fiind înaltă la linezolid (99,33%), teicoplanin (95,95%) și vancomicină (93,24%).

Concluzie: Studiul retrospectiv relevă importanța monitorizării fenotipurilor rezistente pentru limitarea eșecului terapeutic.

Key-words: *urinary infections, antimicrobial resistance, ESBL, HLAR*

Cuvinte cheie: *infecții urinare, rezistență la antimicrobiene, ESBL, HLAR*

Introducere

Infecțiile urinare constituie la nivel global o problemă de sănătate publică datorită cifrelor înalte de morbiditate (150 milioane cazuri/an) antrenând importante costuri economice. (Nienhouse V., 2014; Flores-Mireles A.L., 2015; Donkor E.S., 2019; Gebremariam G., 2019).

Acest tip de patologie este mai frecvent la

femei (25% din totalul infecțiilor, cea mai frecventă localizare a bolilor infecțioase la sexul feminin), la sexul masculin frecvența fiind mai redusă (raportul femei/bărbați este 8/1) dar cu prevalențe mai crescute la sugari și la vârstnici. Diverse studii arată că 40-60% dintre femei au cel puțin o cistită în cursul vieții, 10% dintre infecțiile urinare la sexul feminin fiind în

copilărie și peste 30%, după unii autori, până la 24 de ani (*Al-Badr A., 2013; Flores-Mireles A.L., 2015; Wei Tan C., 2016; Bonkat G., 2017; Gebremariam G., 2019*).

În copilărie, incidența bolii este mai mare la băieți doar în primul an de viață (raportul băieți/fete fiind de 2,8-5,4/1), peste 60% dintre infecțiile urinare în copilărie ale pacienților de sex masculin fiind până la vârsta de 2 ani (*Grabe M., 2013, Vodă D., 2015*).

Infecțiile urinare pot fi dobândite în comunitate sau în spitale și pot fi necomplicate (la persoane fără comorbidități inclusiv la nivelul aparatului urinar) sau pot fi urmate de complicații (recurențe, bacteriemie, insuficiență renală) ce pot fi cauze pentru spitalizări repetate și o povară imensă pentru sistemele de sănătate publică. Infecțiile urinare dobândite în comunitate sunt de obicei necomplicate și afectează predominant femeile fiind favorizate mai ales de activitatea sexuală, utilizarea de contraceptive, istoric de cistită în copilărie. În cazul bărbaților, prevalența este mai crescută la diabetici (*Nienhouse V., 2014; Flores-Mireles A.L., 2015; Donkor E.S., 2019; Gebremariam G., 2019*). Infecțiile urinare dobândite în spitale sunt de obicei complicate (prevalență 1.4-5.1%), cei mai importanți factori de risc fiind cateterizarea urinară recentă și antibioticoterapie recentă (*Wei Tan C., 2016; Bonkat G., 2017*).

Infecțiile urinare constituie cel mai frecvent tip de infecție bacteriană. Studiile indică *Escherichia coli* ca principal agent al infecțiilor urinare comunitare sau din spitale (70-95%). Alți agenți ai infecțiilor urinare din comunitate sunt *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grup B*, *Staphylococcus aureus*. În infecțiile urinare din spitale spectrul etiologic este mai larg, *Pseudomonas aeruginosa* și *Proteus spp.* fiind implicați mai ales la cateterizați (*Al-Badr A., 2013; Aboumarzouk O.M., 2014; Nienhouse V., 2014; Flores-Mireles A.L., 2015; Bonkat G., 2017; Oli A.N., 2017; Gebremariam G., 2019; Donkor E.S., 2019; Gajdacs M., 2019*).

Tratamentul precoce al infecțiilor urinare este de mare însemnătate influențând cifrele de morbiditate; de aceea alegerea corectă a medicamentelor antimicrobiene pentru terapia empirică reduce riscul de eșec terapeutic dar

este și o strategie importantă de prevenire a răspândirii tulpinilor bacteriene rezistente. În acest scop, este necesară evaluarea constantă a datelor locale privind prevalența, etiologia și tiparele de rezistență ale microorganismelor, în contextul național și internațional, dar și istoricul microbiologic și antibacterian al pacientului deoarece uropatogenii înregistrează niveluri tot mai mari de rezistență la antibiotice din diverse clase în toată lumea. Sunt folosite pe scară largă pentru terapia infecțiilor urinare β -lactaminele, inhibitorii de β -lactamaze, fluoro-chinolonele, cefalosporinele de generația a 3-a, carbapenemele. Producția de ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamaze) de tipul CTX-M, TEM, SHV, OXA, β -lactamaze de tip AmpC și mai ales de carbapemenaze sunt mecanisme semnificative de rezistență la bacili Gram negativi (*Aboumarzouk O.M., 2014; Flores-Mireles A.L., 2015; Daoud Z., 2015; Oli A.N., 2017; Gebremariam G., 2019; Gajdacs M., 2019*).

Material și metodă

Obiectivele studiului au fost determinarea spectrului etiologic al infecțiilor urinare la pacienții spitalizați și analizarea pattern-urilor de rezistență la antimicrobiene, aspecte de interes clinic, contribuind la optimizarea terapiei empirice, dar și științific, pentru monitorizarea și controlul selecției de fenotipuri de multirezistență.

Studiul retrospectiv, descriptiv, a implicat pacienți internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov în perioada 1.01-30.06.2019 de la care au fost prelevate probe de urină ce au fost prelucrate bacteriologic în vederea stabilirii etiologiei infecțiilor urinare și testării la antibiotice a bacteriilor izolate (1217 tulpini).

Însămânțarea probelor de urină s-a realizat prin tehnica anselor calibrate, pe medii de cultură selective (mediul MacConkey) și neselective (geloză Columbia cu adaus de 5% sânge de berbec), incubate în condiții de aerobioză la 37°C.

Identificarea germenilor implicați în infecții de tract urinar s-a bazat pe teste biochimice manuale și sistemul VITEK 2 COMPACT.

Antibiogramele au fost interpretate conform CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2019. Au fost practicate și teste difuzimetrice de sinergie pentru detecția tulpinilor producătoare de ESBL (Extended

Spectrum Beta Lactamases), teste cu discuri de gentamicină de 120 µg pentru detecția tulpinilor HLAR (High Level Aminoglycozid Resistance), confirmarea unor fenotipuri de rezistență pe sistemul automat.

Stocarea datelor referitoare la germenii asociați bacteriuriilor semnificative s-a făcut în

baza de date WHO-net.

Rezultate și discuții

Spectrul etiologic al infecțiilor de tract urinar depistate la pacienți spitalizați a fost larg și este ilustrat de Figura 1.

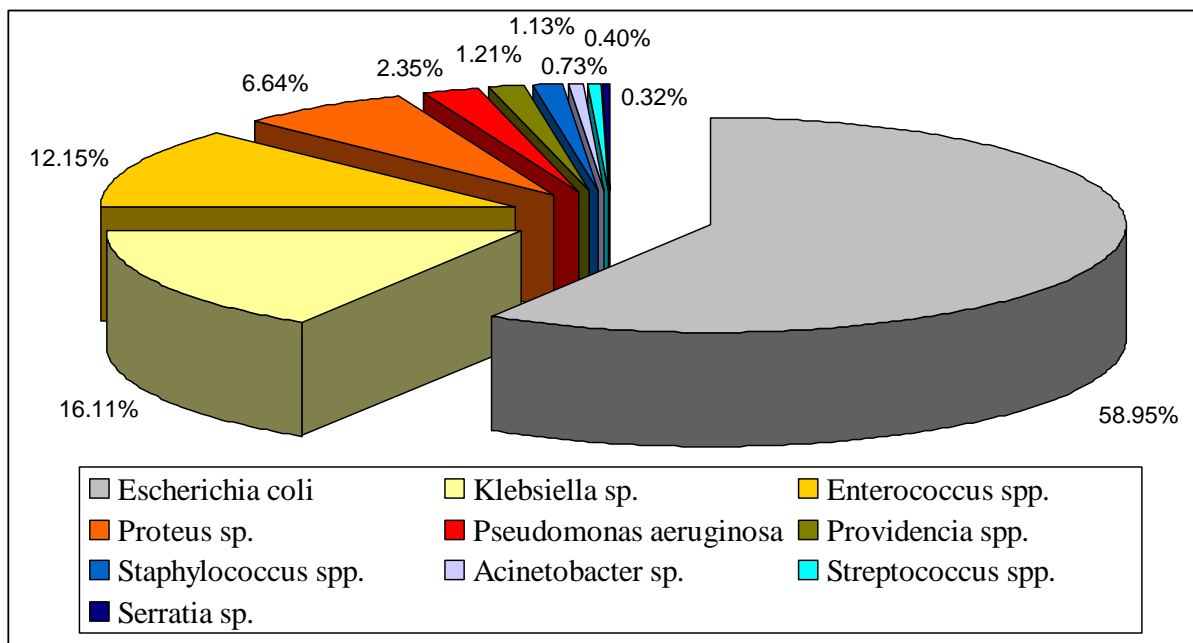


Figura 1 – Spectrul etiologic al infecțiilor urinare în perioada studiată

Majoritatea tulpinilor bacteriene implicate în infecțiile urinare la pacienții spitalizați au fost bacili Gram negativi (86,35%), mai ales din familia Enterobacteriaceae (82,41%). Au fost implicați și coci Gram pozitivi, cu frecvență mai crescută Enterococcus spp (12,33%), urmați de

Staphylococcus spp. și Streptococcus spp.

A fost realizată analiza pattern-urilor de rezistență la antibioticele utilizate uzual în terapie a principalelor categorii de germeni care au produs infecții de tract urinar în perioada studiată este ilustrată de Figurile 2-7.

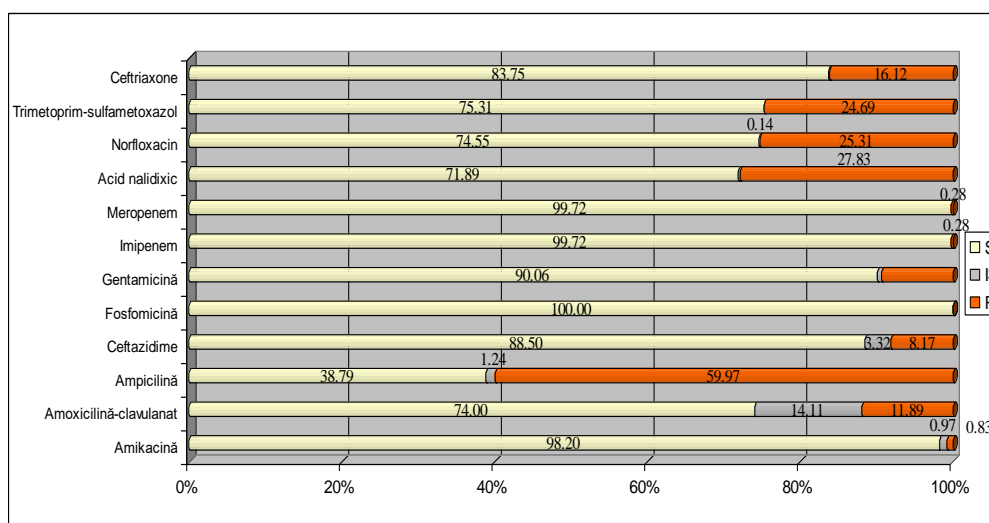


Figura 2 – Sensibilitatea la antibiotice a E. coli

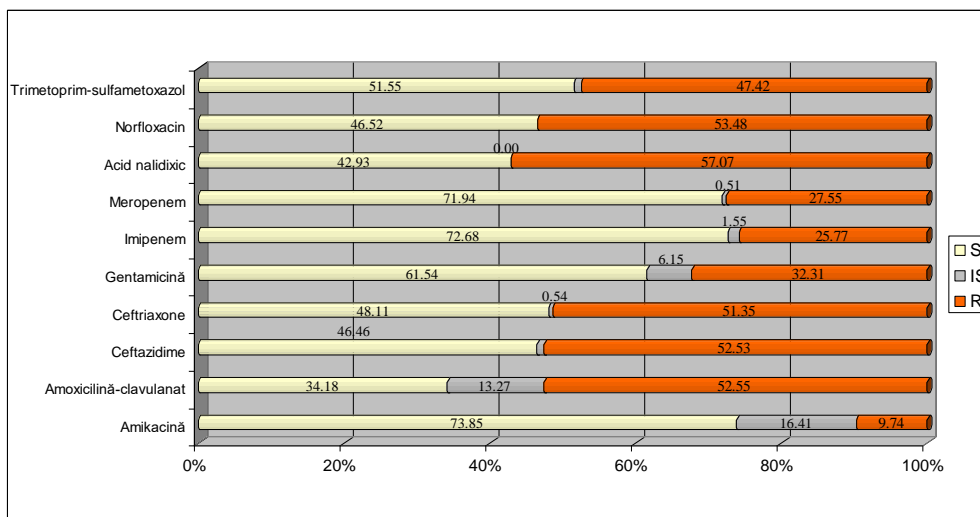


Figura 3 – Sensibilitatea la antibiotice a *Klebsiella spp.*

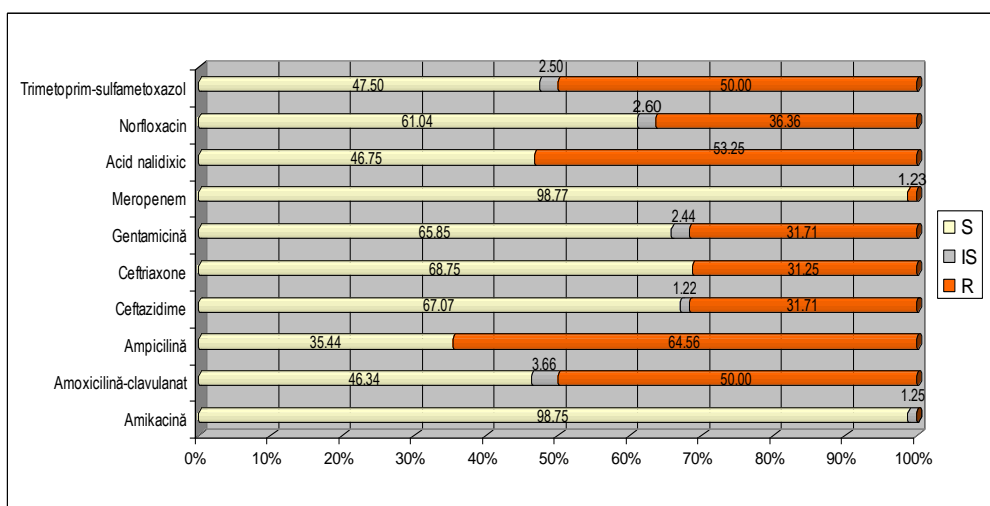


Figura 4 – Sensibilitatea la antibiotice a *Proteus spp.*

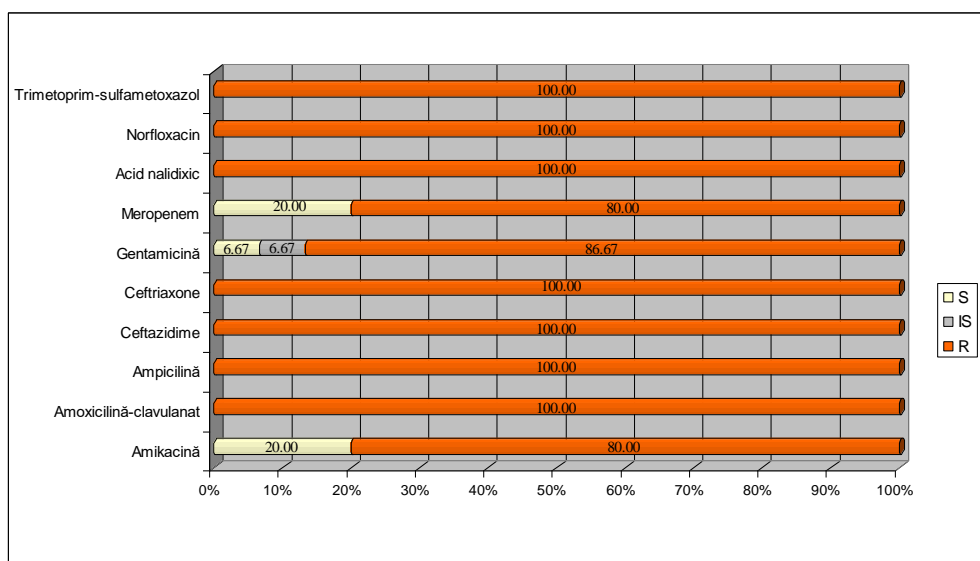


Figura 5 – Sensibilitatea la antibiotice a *Providencia spp.*

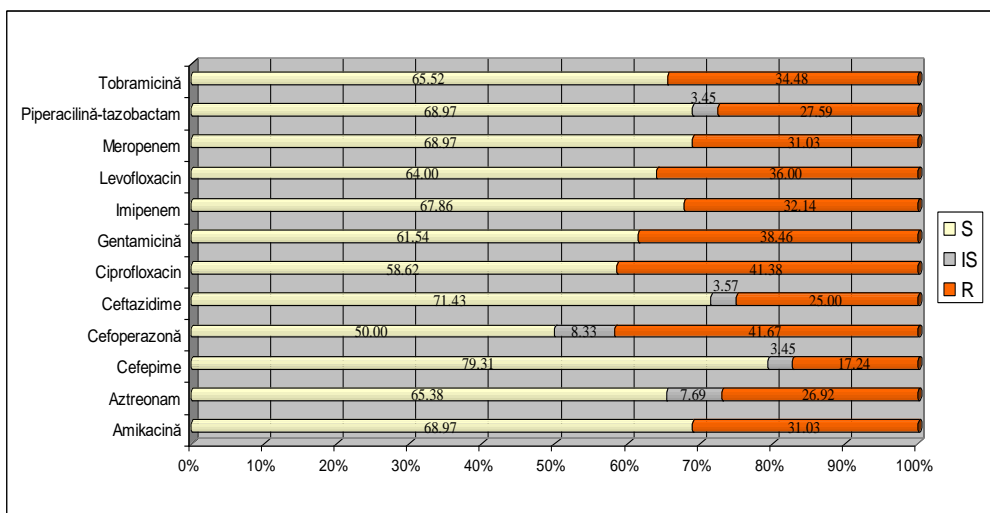


Figura 6 – Sensibilitatea la antibiotice a *Pseudomonas* spp.

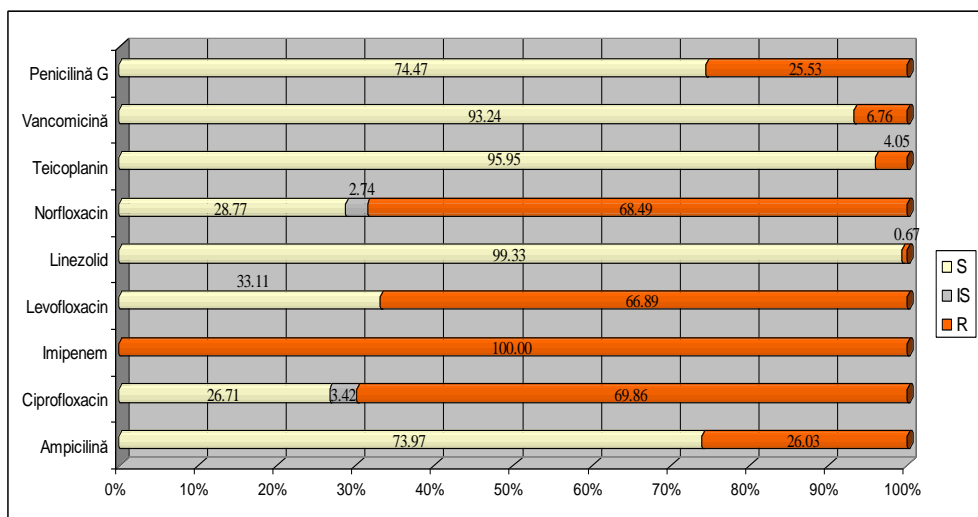


Figura 7 – Sensibilitatea la antibiotice a *Enterococcus* spp.

Pentru celelalte genuri bacteriene implicate în infecții urinare (*Staphylococcus* species, *Acinetobacter* species, *Streptococcus* species, *Serratia* species) nu s-a făcut reprezentarea grafică a rezultatelor antibiogramelor deoarece numărul de cazuri a fost mai redus.

În cazul tulpinilor uropatogene de *Escherichia coli* au fost înregistrate niveluri mai mari de rezistență la ampicilină (59,97%), urmată de acid nalidixic (27,83%), norfloxacin (25,31%) și trimetoprim-sulfametoxazol (24,69%). Sensibilitatea cea mai înaltă a fost la carbapenemele testate (99,72%). Au fost evidențiate și 2 tulpini de *E. coli* rezistente la carbapeneme.

Tulpinile de *Klebsiella* spp. au avut grade variate de rezistență la toate antibioticele testate. Îngrijorătoare este ponderea relativ ridicată a rezistenței la carbapeneme (meropenem – 27,55%, imipenem – 25,77%).

Proteus spp. a avut rezistență variabilă la antibiotice, proporția cea mai ridicată de tulpini sensibile fiind obținută la meropenem (98,77%) și amikacină (98,75%). A fost identificată în urină și o tulpină de *Proteus* spp. rezistentă la meropenem.

Pseudomonas aeruginosa a avut rezistență relativ ridicată la toate antibioticele, inclusiv la carbapenemele testate (meropenem – 32,14%, imipenem – 31,03%), rezultatele fiind influențate și de numărul mai mic al tulpinilor izolate.

Tulpinile de *Enterococcus* spp. au prezentat ponderi relativ ridicate de rezistență la fluoro-chinolonele și β -lactaminele testate. Sensibilitate înaltă a fost înregistrată la linezolid (99,33%), teicoplanin (95,95%) și vancomicină (93,24%).

În cazul tulpinilor de *Providencia* spp. izolate din probele de urină ale pacienților au

fost înregistrate niveluri foarte crescute de rezistență la toate antibioticele testate, aspect negativ pentru prognosticul pacienților deoarece acești germeni au rezistență naturală și la colistină și opțiunile terapeutice sunt limitate în aceste infecții. Un număr mic de tulpini au fost sensibile la amikacină (20%), meropenem (20%) și gentamicină (6,67%).

Ca obiectiv al studiului, au fost analizate și fenotipurile de multirezistență implicate adesea în infecțiile asociate asistenței medicale. Ponderile în cadrul Enterobacteriaceae-lor a tulpinilor ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamases) și CRE (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae) sunt ilustrate de Figurile 8-9.

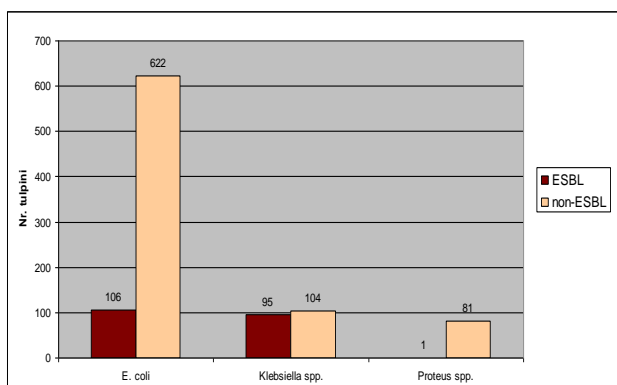


Figura 8 – Distribuția tulpinilor ESBL de Enterobacteriaceae

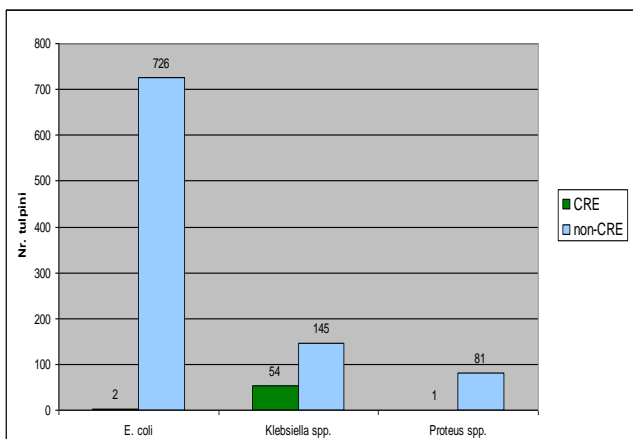


Figura 9 – Distribuția tulpinilor CRE de Enterobacteriaceae

Ponderile tulpinilor HLAR (High Level Aminoglycozid Resistance) și VRE (Vancomycin Resistant Enterococci) de Enterococcus sunt ilustrate de Figurile 10-11.

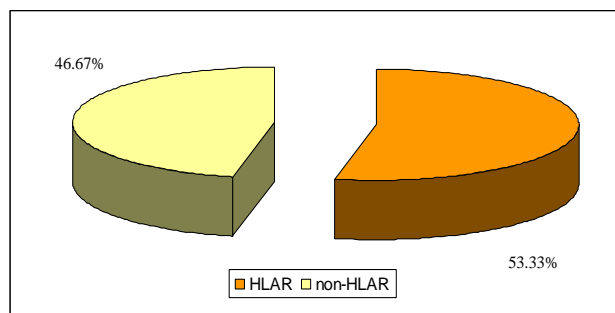


Figura 10 – Ponderea tulpinilor HLAR de Enterococcus

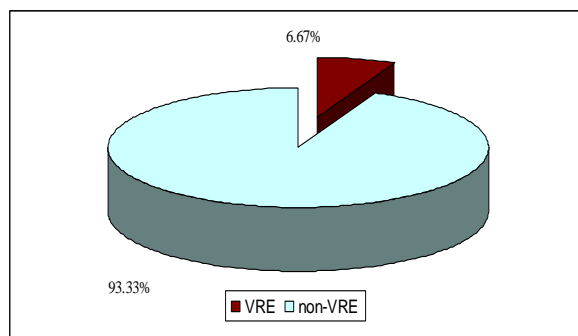


Figura 11 – Ponderea tulpinilor VRE de Enterococcus

Ponderea tulpinilor producătoare de ESBL a fost mai mare la Klebsiella spp. (47,73%) și E. coli (14,56%), la Proteus spp. fiind de 1,21%. Ponderea tulpinilor CRE a fost mai mare la Klebsiella species (27,13), acestea fiind prezente și la E. coli (0,27%) și Proteus species (1,21%), la ultimul gen ponderea fiind influențată și de numărul mai redus de tulpini izolate.

Ponderea tulpinilor HLAR de Enterococcus a fost ridicată la lotul studiat (53,33%) ca și ponderea VRE (6,67%).

Rezultatele studiului au relevat faptul că E. coli este principalul agent al infecțiilor urinare în concordanță cu rezultatele multor studii pe cazuri din comunitate sau din spitale. (Oli A.N., 2017; Gajdacs M., 2019; Gebremariam G., 2019).

Spectrul etiologic al infecțiilor urinare la pacienții spitalizați a inclus și alte genuri de Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter spp. dar și coci Gram pozitivi ca și în alte studii publicate. Ponderea crescută a Enterococcus spp. inclusiv a tulpinilor HLAR ca și prezența VRE ridică dificultăți terapeutice. (Nienhouse V., 2014; Aboumarzouk O.M., 2014; Flores-Mireles A.L., 2015; Oli A.N., 2017; Gebremariam G., 2019; Donkor E.S., 2019; Gajdacs M., 2019)

Rezultatele studiilor asupra uropatogenilor

sunt variate dar adesea indică rezistență relativ ridicată la beta-lactamine, unele cefalosporine cu spectru larg, fluoroquinolone (mai ales la cele cu eliminare urinară), trimetoprim-sulfameoxazol. Sensibilitatea E. coli la fosfomicină a fost de 100%, aspect relevat și de alte studii și care susține faptul că fosfomicina poate fi o opțiune de tratament empiric chiar și în infecțiile cu E. coli ESBL. Nivelurile de rezistență ca și ponderea tulpinilor ESBL și CRE au fost cele mai crescute la Klebsiella spp. ceea ce este în concordanță cu datele din literatura de specialitate. Prezența tulpinilor de Providencia spp. cu niveluri foarte înalte de rezistență la toate antibioticele, chiar 100% la majoritatea antimicrobienele este în concordanță cu alte studii și este un semnal de alarmă (Wie S-H., 2015; Oli A.N., 2017; Sagar S., 2017; Caneiras C., 2019; Gebremariam G., 2019; Gajdacs M., 2019), iar preocuparea pentru monitorizarea rezistenței la antibiotice trebuie să se generalizeze (Falup-Pecurariu, O. 2011, Idomir, 2009, Idomir 2010).

Concluzii

1. Spectrul etiologic a fost larg dar majoritatea speciilor implicate în infecțiile urinare ale pacienților spitalizați au fost bacilii Gram negativi (86,35%), predominant din familia Enterobacteriaceae (82,41%).
2. Frecvență mai ridicată a avut E. coli (59,82%), urmată de Klebsiella spp. (16,35%), Enterococcus spp. (12,33%) și Proteus spp. (6,74%).
3. E. coli a înregistrat niveluri mai ridicate de rezistență la ampicilină (59,97%), urmată de acid nalidixic (27,83%), norfloxacin (25,31%) și trimetoprim-sulfametoxazol (24,69%).
4. Klebsiella spp. a avut grade variate de rezistență la toate antibioticele testate.
5. Proteus spp. a avut rezistență variabilă la antibiotice, sensibilitatea fiind cea mai ridicată la meropenem (98,77%) și amikacină (98,75%).
6. P. aeruginosa a avut rezistență relativ crescută la toate antibioticele, inclusiv carbapeneme.
7. Enterococcus spp. a avut ponderi relativ ridicate de rezistență la fluoroquinolone și beta-lactamine, sensibilitate înaltă fiind observată la linezolid (99,33%), teicoplanin (95,95%) și vancomicină (93,24%), antibiotice de rezervă pentru aceste infecții.
8. Tulpinile de Providencia au avut niveluri foarte mari de rezistență la toate antibioticele opțiunile terapeutice fiind foarte limitate.
9. La lotul studiat au fost evidențiate tulpini de Enterobacteriaceae producătoare de ESBL (Klebsiella spp. – 47,73%, E. coli – 14,56%, Proteus spp. – 1,21%) și CRE (Klebsiella spp. – 27,13%, Proteus spp. – 1,21%, E. coli – 0,27%), prezența rezistenței la carbapeneme fiind îngrijorătoare fiindcă acestea sunt antibiotice de rezervă pentru terapia infecțiilor cu bacili gram negativi.
10. Ponderele tulpinilor HLAR de Enterococcus implicate în infecții urinare a fost ridicată la lotul studiat (53,33%) iar prezența VRE (6,67%) este un semnal de alarmă.
11. Rezultatele studiului subliniază importanța monitorizării rezistenței în vederea optimizării terapiei empirice și a managementului acestor cazuri.

References

- [1] Aboumarzouk O.M. - Extended spectrum beta-lactamase urinary tract infections, Urology Annals, 2014, 6(2), pg. 114-115.
- [2] Al-Badr A., Al-Shaikh G. – Recurrent urinary tract infections management in women, Sultan Qaboos Univ Med J. 2013, 13(3) 359–367.
- [3] Bader M.S., Loeb M., Brooks A.A. - An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance, Postgrad Medicine, 2017, 129(2), pg. 242-258.
- [4] Bonkat G., Pickard R., Bartoletti R., et al - EAU Guidelines on Urological Infections European Association of Urology, 2017, pg. 7-21.
- [5] Caneiras C., Melo-Cristino J., Duarte A. - Community- and hospital-acquired Klebsiella pneumoniae urinary tract infections in Portugal: virulence and antibiotic resistance, Microorganism, 2019, 7(5):138.
- [6] Cho Y.H., Jung S.I., Chung H.S., et al - Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in health care-associated urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomicin, International Urology and Nephrology, 2015, 47(7).
- [7] Daoud Z., Sokhn E.S., Masri K., et al - Escherichia coli isolated from urinary tract

- infections of lebanese patients between 2005 and 2012: Epidemiology and Profiles of Resistance, *Frontiers in Medicines*, 2015, pg. 2-26.
- [8] Donkor E.S., Horlortu P.Z., Dayie N., et al - Community acquired urinary tract infections among adults in Accra, Ghana, *Community acquired urinary tract infections among adults in Accra, Ghana – Infections and Drug Resistance*, 2019, 12:2059-2067.
- [9] Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. - Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nature Reviews Microbiology*, 2015, vol. 13, pg. 269-284.
- [10] Falup-Pecurariu, O., Bleotu, L., Zavarache, C., Peled, N., Anton, O., Robu, M... & Dagan, R. *Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization in children in Brasov, Central Romania: high antibiotic resistance and coverage by conjugate vaccines. The Pediatric infectious disease journal*, 2011, 30(1), 76-78.
- [11] Gajdacs M., Abrok M., Burian K. - Comparative epidemiology and resistance trends of common urinary pathogens in a tertiary-care hospital: a 10-year surveillance study, *Medicina*, 2019, 55(7).
- [12] Gebremariam G., Legese H., Woldu Y, et al - Bacteriological profile, risk factors and susceptibility patterns of symptomatic urinary tract infection among students of Mekelle University, northern Ethiopia, *BMC Infections Diseases*, 2019, pg. 3.
- [13] Grabe M., Bjerklund-Johansen T.E., Botto H., et al - Guidelines on urological infections. Urinary tract infections in children, *European Association of Urology 2013*, pg. 42-49. <https://uroweb.org/guideline/urological-infections/>(accesat în 9 mai 2020)
- [14] Idomir, M. E., Rogozea, L., & Nemet, C. G. Web-services for monitoring the resistance to antibiotics of pathogen germs. In *Proceedings of the 11th WSEAS international conference on Mathematical methods and computational techniques in electrical engineering*, 2009, pp. 531-534.
- [15] Idomir, M. E., Cocuz, M. E., Cheșcă, A., & Nemet, C. G. Analysis of results and optimization of a WEB-based program used for the antibiotic resistance surveillance in a Romanian university hospital. In *Proceedings of the 12th WSEAS international conference on Mathematical and computational methods in science and engineering*, 2010, pp. 215-220
- [16] Nienhouse V., Dong X., et al - Interplay between bladder microbiota and urinary antimicrobial peptides: mechanisms for human urinary tract infection risk and symptom severity, *PLoS One*, 2014, 8;9(12):e114185.
- [17] Oli A.N., Akabueze V.B., Ezeudu C.E., et al - Bacteriology and antibiogram of urinary tract infection among female patients in a tertiary health facility in south eastern Nigeria, *Open Microbiology Journal*, 2017, 11, pg. 292-300.
- [18] Ozturk R., Murt A. - Grabe M., Bartoletti R., Bjerklund J., et al - Guidelines on Urological Infections, *European Association of Urology*, 2015, pg.11-24.
- [19] Sagar S., Narasimhaswamy N., D'Souza J. - Providencia rettgeri: An Emerging Nosocomial Uropathogen in an Indwelling Urinary Catheterised Patient, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2017, 11(6): DD01–DD02.
- [20] Vodă D., Mihăescu S.M.S. – Aspecte clinico-evolutive în infecțiile de tract urinar la copii, *Jurnal Medical Brașovean*, 2015, nr. 2, pg. 80-82.
- [21] Wei Tan C., Chlebicki M. - Urinary tract infections in adults, *Singapore Medical Journal*, 2016, 57(9), pg. 485-490.
- [22] Wie S-H. - Clinical significance of Providencia bacteremia or bacteriuria, 2015, 30(2): 167-169.

Sources of funding: None.

Conflicts of interest: The author have no conflicts of interest relevant to this article.

Acknowledgments: NO.

Authors' contributions: Conceptualization: MI; research design: MI,; validation of the methodology: MI; data collection: MI; data analysis and / or data interpretation: MI; writing-preparing the original text: MI; review and editing: MI