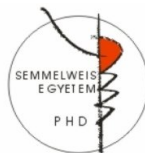


**Áramlási citometrián alapuló gyors módszer  
baktériumok antibiotikum rezisztencia  
profiljának meghatározására**

Doktori tézisek

**Dr. Kállai András**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

dr. Lőrincz M. Ákos, PhD, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Ludwig Endre, PhD, professor emeritus

Dr. Tóth József, PhD

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnöke: Dr. Domján Gyula, CSc, professor emeritus

Tagjai: Dr. Zima Endre, PhD, egyetemi tanár

Dr. Kovács Miklós, PhD

Budapest  
2024

## **1. BEVEZETÉS**

A mindennapi klinikai gyakorlatban egyre inkább előtérbe kerül a baktériumok antibiotikum rezisztenciájának kérdésköre, miközben egyre fenyegetőbb, globális egészségügyi problémává váltak a polirezisztens baktériumtörzsek. A World Health Organization (WHO) megállapítása alapján világszerte veszélyes ütemben nő az antimikrobiális rezisztencia (AMR). Mindez az infekciókhoz köthető mortalitás és morbiditás szignifikáns romlásához vezet. Emellett különösen az intenzív osztályon kezelt, súlyos állapotú betegek esetén életbevágó a mielőbbi mikrobiológiai diagnosztika, beleértve a kórokozó baktérium antibiotikum érzékenységi profiljának ismeretét is.

A fertőzés gyanított vagy igazolt forrása alapján levett mikrobiológiai minták lehetővé teszik a kórokozó identifikálását és ezt követően az antibiotikum érzékenységi profil megállapítását. Mindez azonban időigényes folyamat, ezért intenzív kutatások tárgyát képezik a gyors, effektív és költséghatékony antibiotikum érzékenységi tesztek (antibiotic susceptibility test – AST) lehetőségei. Az ideális antibiotikum érzékenységi teszt

megbízható, gyors, olcsó, automatizálható, magas áteresztőképességgel bír és egyszerű adatkezelése biztosított. Sajnálatos módon ilyen ideális teszt egyelőre nem áll rendelkezésünkre.

Az elmúlt évtizedekben számos kutatást publikáltak áramlási citométerrel történt antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról. Bizonyított, hogy az áramlási citométer a baktériumok morfológiájának, metabolikus aktivitásának és életképességének vizsgálatára is alkalmas. A több évtized, számos vizsgálat és biztató eredmények ellenére az áramlási citometria mind a mai napig nem hódított teret magának az AMR-t meghatározó módszerek között. Az eddigi vizsgálatok jellemzően nem törekedtek kvantitatív érzékenységi profil megállapításra, MIC meghatározásra, megelégedtek a szenzitív vagy rezisztens kvalitatív eredménnyel. A kutatócsoportunk által fejlesztett áramlási citométer alapú módszer MIC meghatározás segítségével állapítaná meg a baktériumok fenotípusos antibiotikum rezisztencia profilját.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

1. A rutin klinikai laboratóriumban elérhető BD FACSCalibur™ áramlási citométer baktériumok megbízható detektálására való alkalmasságának igazolása: a nem baktériumok detektálására konstruált áramlási citométer megfelelő beállítások mellett megbízhatóan detektálni képes a baktériumok számának változását.

2. A megbízható, diszkriminatív változáshoz szükséges inkubálási idő hosszának, vagy még pontosabban, a szükséges baktérium szám változás mértékének (osztódási ciklusok számának) meghatározása.

3. Az áramlási citométerrel meghatározott MIC értékek validálása a hagyományos gold standard MIC meghatározására szolgáló vizsgálatokkal (ennek keretében az új eljárással kapott MIC értékekből az EUCAST adatbázis alapján meghatározott antibiotikum érzékenységi profilokat is összevetettük a hagyományos mikrodilúciós eljárással kapott profilokkal).

4. A 3. pontban meghatározott validálási eljárás keretében a gyakorlati alkalmazás számára egyszerűen alkalmazható képlet vagy eljárási szabály megalkotása, melynek segítségével a hagyományos gold standard módszerhez

hasonlóan eldönthetjük, hogy az adott antibiotikum koncentráció mellett a baktérium osztódásra, felnövekedésre képes-e.

5. Áramlási citométer segítségével MIC meghatározáson alapuló antibiotikum érzékenységi teszt kidolgozása, mely a gold standard mikrobiológiai módszerekhez hasonló megbízhatósággal, de lényegesen rövidebb idő alatt elvégezhető.

### 3. MÓDSZEREK

Méréseinket FACSCalibur™ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) áramlási citométerrel végeztük. A mérések során az elsődleges analízis a citométerhez csatlakoztatott Macintosh számítógépen BD CellQuest™ Pro programmal történt, majd az eredmények kiértékelését WinMDI 2.9 (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility) programmal végeztük el.

Kísérleteink során segítségével hat különböző laboratóriumi baktériumtörzsszel dolgoztunk: *Escherichia coli* (ATCC:25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC:700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC:29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:27855), *Streptococcus*

*pyogenes* (HNCMB 80003) és *Staphylococcus aureus* (ATCC:29213).

Az egyes baktériumok kapcsán optikai denzitás méréssel standardizált törzsoldatot készítettünk, steril, 0,9%-os NaCl oldatba transzferált baktériumok 0,5 McFarland oldatának 10-szeres hígításával. A törzsoldatból 10 µl-t oltottunk 90 µl Mueller-Hinton (MH) vagy Luria-Bertoni (LB) táptalajra. A mintákat 37 °C-on, aerofil körülmények között inkubáltuk. Az inkubálásra 96-lyukú lemezekben került sor, 12-féle antibiotikum (*vancomycin*, *ciprofloxacin*, *levofloxacin*, *ceftriaxon*, *cefepim*, *amoxicillin-klavulánsav*, *piperacillin-tazobactam*, *trimethoprim-sulfamethoxazole*, *cefazolin*, *colistin*, *imipenem*, *gentamicin*) felező hígítással előállított különböző koncentrációi mellett.

Az inkubálást követően a mintánkat pH 3-ra titrált Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oldattal fixáltuk és Acridine orange (AO) fluoreszcens festékkal jelöltük, majd áramlási citométer segítségével a baktériumokat számszerűsítettük. A számszerűsítéshez kapuzási eljárással kizártuk a készülék elektromos zajából és a

fluoreszcens festéket tartalmazó fixáló és tápoldatunk keverékéből adódó háttérzajt.

Korábbi áramlási citométerrel történt vizsgálatok akár 2 órás inkubációs periódus után eredményt adtak. Ezek a korábbi vizsgálatok azonban a sejtek életképessége, membrán károsodása vagy membránpotenciál változása alapján diagnosztizáltak. Pilot méréseink során azt találtuk, hogy a módszerünkkel, a MICy-vel, 2 órás inkubációs idő után gyakran nem tapasztaltunk oly mértékű változást a baktériumok számában, hogy valóban diszkriminatív lehetett volna a mérés. A túl rövid inkubációs idő az érzékenységi profil meghatározása során tévedéshez vezethet.

Az optimális inkubációs idő meghatározására ezért antibiotikummentes közegben hat órán keresztül óránként három-három mérést végeztünk mind a hat általunk vizsgált baktériummal, mind MH, mind LB táptalajon.

A 96 lyukú lemezünk nyolcadik sorában mérés technikailag elengedhetlen oldatokat helyeztünk el. 3 lyukban baktériummentes tápoldat volt, melyből 90  $\mu$ l-t szintén fixáló oldatba pipettáztunk a háttérzaj meghatározása céljából. Ennek kapuzott értékét minden

mérési eredményünkből ki kell vonnunk, hogy megkaphassuk a baktériumok valódi számát.

A törzsoldat kiindulási baktériumszámának meghatározásához 3 lyukat az inkubálási periódus végeztével fertőztünk be a mindedig az osztódást megakadályozandó 0,9%-os NaCl oldatban, 4 °C-on tartott törzsoldat felhasználásával. A továbbiakban az osztódás megindulását a rövid időn belül alkalmazott fixálási és jelölési eljárásunk akadályozta meg.

A maximális felnövekedés vizsgálatára szintén három lyuk szolgált, melyek antibiotikum mentes tápoldatát a törzsoldat 10 µl-ével fertőztünk be inkubálás előtt.

A MIC értékek összehasonlítására párhuzamosan indítottunk kettő, azonos módon készített, tápoldatot és az előző fejezetben leírtak szerinti antibiotikum koncentrációkat tartalmazó, 96-lyukú lemezt.

Az egyiket, a mikrodilúciós lemezt 24 órás inkubáció után mikrobiológus vizuálisan értékelték. A másik lemezt MICy módszerrel értékeltük.



A baktériumok számszerűsítése mellett a felnövekedés küszöbértékének meghatározására a következő szabályt alkalmaztuk:

**Ad 1.** Küszöbérték a kiindulási baktériumszám  
abban az esetben, ha

**Ad 2.** a következő felezőhígításban a baktériumszám meghaladja a kiindulási baktériumszám kétszeresét.

*Staphylococcus aureus* esetén azt tapasztaltuk, hogy hajlamos összekapaszkodásra, így tömegdetektálás léphet fel, egy eseményként kerül regisztrációra több áthaladó baktérium. Ezért minden mérési pontra egy képletes számot képeztünk az események száma és az adott mérés oldalirányú fényszórás (side scatter – SSC) csatornáján rögzített geometrikus átlagának szorzataként. Minél több esemény minél összetettebb formát (magasabb geometrikus átlagot) mutatva regisztrálható, annál több *Staphylococcus* haladt át az áramlási cellán.

Az így képzett számokra alkalmaztuk aztán a 3.5. fejezetben ismertetett szabály módosított formáját:

**Ad 1.** Küszöbérték a kiindulási kombinált paraméter (eseményszám x geometrikus átlag) abban az esetben, ha

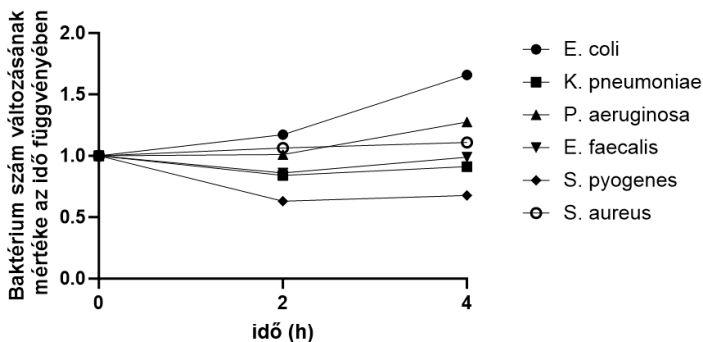
**Ad 2.** a következő felezőhígításban mért kombinált paraméter értéke meghaladja a kiindulási kombinált paraméter kétszeresét.

A vizsgálatunk során a statisztikai analízist a GraphPad Prism (GraphPad Software LLC, Boston, USA, (dba Dotmatics)) online verziójával végeztük 2020. január 7-ei eléréssel (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>), illetve a későbbiekben a GraphPad Prism 10.1.1. asztali verziójával (GraphPad Software LLC, Boston, USA, (dba Dotmatics)Egyutas, ismételt méréses varianciaanalízissel (one way, repeated measures ANOVA) vizsgáltuk az AO-val jelölt, fixált mintákban a baktériumok számának változását a várakozási idő függvényében. A MICy és a mikrodilúció közötti egyezés vizsgálatára Fleiss' kapa módszert alkalmaztunk az adatokat az ISO/DIS 20776-2 (2007) standardnek megfelelően elemezve.

#### **4. EREDMÉNYEK**

A pH 3-ra titrált fixáló oldat a DNS-hez és RNS-hez kötődő fluoreszcens festék hatását antibiotikum mentes

tápodatara oltott baktériumok háromszor ismételt mérésével vizsgáltuk.

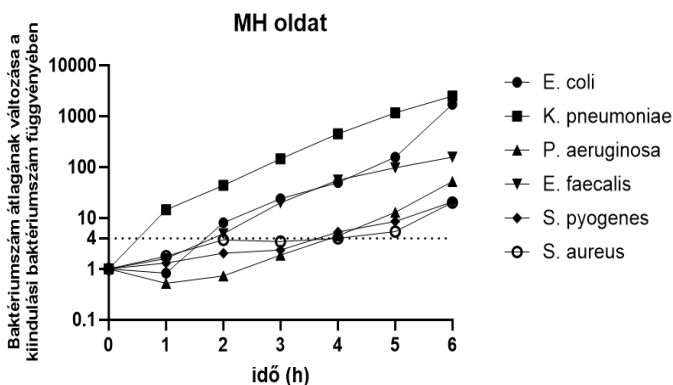


1. ábra A fixálás és fluoreszcens jelölés hatása a baktériumok osztódási képességére MH táptalajon három mérés átlagértékei változásának mértékét megjelenítve

A fixálás után 2 és 4 órával érdemi változást a baktériumok számában nem látunk, egyedül az *E. coli* tekintetében látható csekély mértékű osztódásnak megfelelően számváltozás. Az adatokat egyutas, ismételt mérés varianciaanalízissel vizsgálva a változások nem szignifikáns mértékűek.

Az antibiotikum mentes táptalajokon végzett óránkénti méréssel hat órán keresztül vizsgáltuk a baktériumok számának változását. A pilot méréseink alapján

megállapítottuk, hogy a módszerünk kellően diszkriminatív voltához legalább két osztódási ciklusra szükség van, vagyis a baktériumok számának négyszeres változása esetén várható, hogy a mérésünket megfelelően tudjuk majd értékelni.

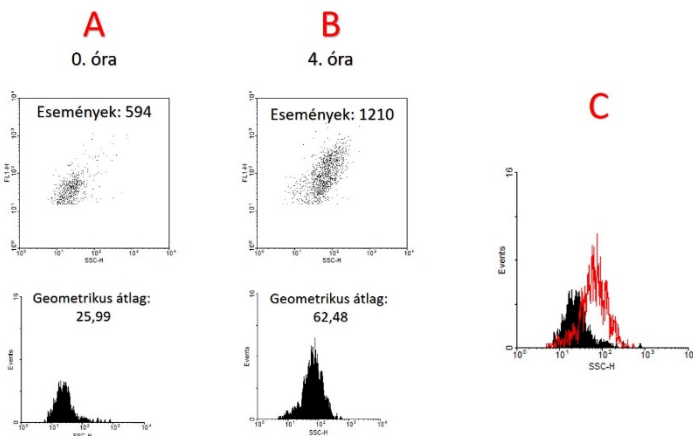


**2. ábra A baktériumok számának változása az idő függvényében a kiindulási baktériumszám arányában**

A kiindulási baktériumszám arányában ábrázolva láthatjuk, hogy a pilot méréseink során megállapított kiindulási baktérium szám négyszeresét (az ábrákon szaggatott vonallal jelölve) 4 órás inkubáció után érik el a baktériumok.

Megállapítható, hogy a *Staphylococcus aureus* esetén a mért események száma alig változik, alig nő. Ennek kapcsán megvizsgáltuk, hogy a baktériumok számának mérsékelt növekedése mellett az oldalirányú fényszórás, vagyis az SSC csatornán miként változik a mérhető

paraméter, mely a mért események összetettségére, granuláltságára utal. A kiindulási és a 4 óra inkubáció után kapott baktérium populációkat jellemző eredményeket a 3. ábra mutatja be.



**3. ábra *Staphylococcus aureus* esetén az eseményszám és az SSC csatornán mért geometrikus átlag kiinduláskor és 4 óra inkubációt követően**

Az ábra „A” részén a kiinduláskor detektált eseményszám látható az SSC-FL1 dot ploton, illetve alatta az SSC csatornán a detektált eseményekhez tartozó hisztogram, annak geometrikus átlagával.

Az ábra „B” részén a 4 óra inkubációt követően detektált eseményszám látható az SSC-FL1 dot ploton, illetve alatta az SSC csatornán a detektált eseményekhez tartozó hisztogram, annak geometrikus átlagával.

Az ábra „C” részén a kiindulási és 4 óra inkubálás utáni hisztogramok átfedő ábrája látható, mely alapján a hisztogram a nagyobb értékek, azaz magasabb összetettség, granuláltság irányában mozdul el. Ennek hátterében vélhetőleg az összetapadó, összekapaszkodó *Staphylococcus aureus* baktériumok által magasabb arányban oldalra szórt fény állhat.

Bár a kiindulási eseményszám alig duplájára változott 4 óra inkubáció után ( $1210/594=2,03$ ), miután a geometrikus átlag változása szintén meghaladja a kétszeres értéket ( $62,48/25,99=2,40$ ), így az ezek összeszorozásával a 3.6. fejezetben leírtaknak megfelelően nyert kombinált paraméért arányában már több mint négyszeresére változik ( $2,03*2,40=4,88$ ).

A hat vizsgált baktérium kapcsán tizenkét antibiotikum esetén határoztunk meg hét felező hígítási mérési ponton, hogy történt-e növekedés, minden mérést háromszor ismételve, két különböző táptalajon, két különböző módszerrel. Ennek eredményeként összesen 3024, összehasonlításra alkalmas adatpárt kaptunk. Az adatpárok pontról pontra történő egyezésének mértékét Fleiss' kappával vizsgáltuk.

**1. táblázat A mikrodilúcióval és a MICy-vel kapott eredmények összehasonlítása pontról pontra**

Az összehasonlítás első tagja (a „/” jel előtt) a mikrodilúcióval kapott eredmény, a második tag MICy-vel kapott eredmény. „+” jel esetén növekedést tapasztaltunk az adott ponton, „-” jel esetén gátlást.

Táptalaj	Gram szerint	Mérések száma	+/+	-/-	Egyezés %	-/+	+/-	Eltérés %	Fleiss' kappá +/- SE
LB	Gram pozitív	756	234	413	<b>85,60%</b>	103 (13,6%)	6 (0,8%)	<b>14,40%</b>	<b>0,700 +/- 0,026</b>
	Gram negatív	756	394	277	<b>88,80%</b>	36 (4,8%)	49 (6,5%)	<b>11,20%</b>	<b>0,770 +/- 0,024</b>
LB össz	Mind	1512	628	690	<b>87,20%</b>	139 (9,2%)	55 (3,6%)	<b>12,80%</b>	<b>0,744 +/- 0,017</b>
MH	Gram pozitív	756	249	397	<b>85,40%</b>	98 (12,9%)	12 (1,6%)	<b>14,60%</b>	<b>0,701 +/- 0,026</b>
	Gram negatív	756	394	284	<b>89,70%</b>	49 (6,5%)	29 (3,8%)	<b>10,30%</b>	<b>0,789 +/- 0,023</b>
MH össz	Mind	1512	643	681	<b>87,60%</b>	147 (9,7%)	41 (2,7%)	<b>12,40%</b>	<b>0,752 +/- 0,017</b>
Összes	Mind	3024	1271	1371	<b>87,40%</b>	286 (9,6%)	96 (3,2%)	<b>12,60%</b>	<b>0,748 +/- 0,012</b>

Ezt követően a MIC meghatározás a definíciójának megfelelően történt: az a legalacsonyabb antibiotikum

koncentráció, mely gátolja a baktérium növekedését. A hat vizsgált baktérium kapcsán tizenkét antibiotikum esetén határoztunk meg MIC értéket, minden mérést háromszor ismételve, két különböző táptalajon, két különböző módszerrel. Ennek eredményeként összesen táptalajonként 216, összehasonlításra alkalmas MIC adatpárt kaptunk.

Adatainkat a ISO/DIS 20776-2 (2007) standardnek megfelelően is elemeztük. Az alapvető egyezés (essential agreement - EA) (MIC adatpár +/- 1 felezőhígításnyi eltérést mutat) MH esetén 80,1%-nak adódott és a súlyozott kappa érték is erős összefüggést mutatott. Elvégeztük a standard szerinti eltérés feloldására szolgáló (discrepancy resolution) tesztet is az EA valódi értékének megállapítás céljából. Ez alapján MH táptalajon Gram negatív baktériumok esetén az EA 94%, Gram pozitív baktériumok esetén 83%, míg az összesített érték közel 89%-nak adódott. A standard szerint elemeztük a bias értékét is: a MICY 39,9%-ban mért magasabb MIC értéket és 22,7%-ban alacsonyabbat, a kettő különbségeként a bias 17,2%-nak adódott.

2. táblázat A két módszer által meghatározott MIC értékek összehasonlítása az ISO/DIS 20776-2:2007 szerint

Táptalaj	Gram szerint	Mérések száma	Essential agreement - EA (%)	Eltérés feloldása (Discrepancy resolution testing) - EA (%)	Súlyozott Fleiss' kappá
LB	Gram pozitív	108	88 (81,5%)	69,40%	0,66
	Gram negatív	108	79 (73,1%)	86,10%	0,731
LB össz	Mind	216	167 (77,3%)	77,80%	0,706
MH	Gram pozitív	108	<b>83 (76,9%)</b>	<b>83,30%</b>	<b>0,662</b>
	Gram negatív	108	<b>90 (83,3%)</b>	<b>94,40%</b>	<b>0,76</b>
MH össz	Mind	216	<b>173 (80,1%)</b>	<b>88,90%</b>	<b>0,72</b>
Összes	Mind	432	340 (78,7%)	83,30%	0,714

Az EUCAST ajánlás MIC meghatározásra MH táptalaj alkalmazását javasolja, így az érzékenységi profil összehasonlításokat csak MH táptalajon nyert adatokkal végeztük el. A két módszerrel meghatározott rezisztencia profilok összevetése során 92,5%-ban egyezést találtunk. Két AST összevetésekor három féle hibát tapasztalhatunk. Minor hibának nevezzük, ha a referencia módszerrel mérsékelt érzékenységet, a vizsgált módszerrel pedig érzékenységet találunk. Súlyos hiba, ha az új módszer rezisztenciát állapít meg, míg a referencia módszer érzékenységet. Nagyon súlyos hiba, ha a vizsgálati



módszer érzékenynek találja a baktériumot egy adott antibiotikumra, míg a referencia módszer rezisztensnek. Ebben az utóbbi esetben egy hibás antibiotikum választás akár veszélyes is lehet egy súlyos állapotú, intenzív osztályon kezelt beteg számára.

A minor, súlyos és nagyon súlyos eltérések gyakoriságának elemzésére ismét az ISO/DIS 20776-2 (2007) standardet vettük alapul.

**3. táblázat A mikrodilúcióval és a MICy-vel meghatározott érzékenységi profilok összehasonlító elemzése**

„R” rezisztenciát, „S” érzékenységet jelent. A minor, súlyos és nagyon súlyos eltérések arányát az ISO/DIS 20776-2 (2007) standard szerint kalkuláltuk.

Gram szerint	Mérések száma	R/R	S/S	Egyezés %	Minor eltérés	Súlyos eltérés	Nagyon súlyos eltérés	Fleiss' kappa +/- SE
Gram pozitív	105	40	60	<b>95,20%</b>	0 (0%)	5 (7,7%)	0 (0%)	<b>0,865</b> +/- <b>0,049</b>
Gram negatív	108	52	45	<b>89,80%</b>	3 (2,8%)	5 (10%)	3 (5,5%)	<b>0,795</b> +/- <b>0,058</b>
Mind	213	92	105	<b>92,50%</b>	3 (1,4%)	<b>10</b> <b>(8,7%)</b>	<b>3</b> <b>(3,2%)</b>	<b>0,849</b> +/- <b>0,036</b>

A Fleiss'kappa analízis 0,849 kappa értékét Landis és Koch szerint értékelve, „majdnem tökéletes” egyezés

(kappa érték: 0,8-1 között) van a két módszer döntéshozatala között. Megjegyzendő azonban, hogy a nemzetközi standard által az új módszertől elvárt 3% alatti súlyos és nagyon súlyos eltérési gyakoriságot súlyos eltérések tekintetében jelentősen (8,7%) és nagyon súlyos eltérések tekintetében enyhén (3,2%) meghaladtuk.

## **5. KÖVETKEZTETÉSEK**

A doktori munkám során levont következtetések:

1. A BD FACSCalibur™, annak ellenére, hogy nem kifejezetten baktériumok detektálására konstruált áramlási citométer, képes megbízhatóan detektálni a baktériumok számának változását.
2. A megbízható, diszkriminatív döntéshozatalhoz legalább négyszeres baktériumszám változás szükséges, ami az általunk vizsgált laboratóriumi baktériumok esetében 4 órás inkubáció jelent.
3. A felnövekedés küszöbértékének a kiindulási baktériumszám adódott abban az esetben, ha következő felező hígításnál legalább a kétszeresét találtuk a küszöbértéknek.
4. A MICy megbízhatósága és reprodukálhatósága MIC

érték meghatározás tekintetében hasonló a gold standard eljáráshoz, lényegesen gyorsabb idő alatt ad érzékenységi profilt a MIC értékeket az EUCAST adatbázissal összevetve, azonban a laboratóriumi ISO szabvány által elvárt határértékeket nem minden ponton teljesíti.

## **6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### **I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:**

**Kállai A, Kelemen M, Molnár N, Tropotei A, Hauser B, Iványi Zs, Gál J, Ligeti E, Kristóf K, Lőrincz ÁM**

**„MICy: a Novel Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Minimal Inhibitory Concentration”**

MICROBIOLOGY SPECTRUM 9: 3 Paper: e00901-21, 10 p. (2021)

### **II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények és poszterek:**

Kovács E, **Kállai A**, Fritúz G, Iványi Z, Mikó V, Valkó L, Hauser B, Gál J „The efficacy of virtual distance training of intensive therapy and anaesthesiology among fifth-year medical students during the COVID-19 pandemic: a cross-

sectional study” BMC MEDICAL EDUCATION 21 (1)

Paper: 393, 10 p. (2021)

**Kállai A**, Skultéti D, Párkányi A, Bíró E., Fehér A, Szombath G, Iványi Z, Fazakas J, and Gál J. “Safe Delivery of Prolonged Thrombolysis Treatment for Pulmonary Embolism Using ClotPro Viscoelastic Test - Preliminary Results.” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 11 (suppl 1):359. 2023.

Párkányi A, Bíró E, Skultéti D, Kovács E, Fehér A, **Kállai A**, Iványi Zs, Fazakas J, and Gál J “Fibrinolysis Resistance Duration after Tranexamic Acid Administration: How Is It Affected by Renal Insufficiency?” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 11 (suppl 1): 635. 2023.

**Kállai A**, Párkányi A, Skultéti D, Kanász N, Kovács E, Mogyoródi B, Fehér A, Iványi Zs, Fazakas J, and Gál J. “The Effect of COVID-19 on the Comparability of the Traditional and Viscoelastic Coagulation Monitoring.” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 10 (part 2): 44 (000719)-44. 2022.