

Stenotrophomonas maltophilia törzsek klinikai mikrobiológiai vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Juhász Emese Réka

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kristóf Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Deák Judit, Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Kenesei Éva, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Benyó Zoltán, DSc., egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Tulassay Tivadar, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár

Dr. Folyovich András, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2018

1. Bevezetés

A *Stenotrophomonas maltophilia* az elmúlt két évtizedben jelentős opportunista, nozokomiális kórokozóvá vált világszerte. A *Pseudomonas aeruginosa*t és az *Acinetobacter baumannii*t követően a harmadik leggyakoribb nozokomiális fertőzést okozó baktérium a Gram-negatív, glükózt nem fermentáló pálcák csoportjából. A World Health Organisation a legjelentősebb antibiotikum rezisztens kórházi kórokozók listájára helyezte. Napjainkra a közösségben szerzett *S. maltophilia* fertőzések is ismertté váltak. A fertőzés általában pneumoniaként vagy véráram fertőzésként jelenik meg. Természetes antibiotikum rezisztenciája enzimtermelése (például L1- és L2- β -laktamáz, különböző aminoglikozid transferázok), efflux rendszerei (például SmeABC – SmeYZ, MacABC) és alacsony külső membrán permeabilitása miatt igen kiterjedt, ezért a terápiás lehetőségek szűkösek, néhány antibiotikumra korlátozódnak. Az ajánlott, elsőként választandó antibiotikum *S. maltophilia* fertőzésben a sulfamethoxazol-trimethoprim (SXT), de számos tényező (a beteg túlérzékenysége az antibiotikumra, a baktérium rezisztenciája) kizárhatja alkalmazását. Ilyenkor a baktérium egyéb antibiotikumokra, például fluorokinolonokra vagy tetracyclin származékokra való érzékenységének meghatározása szükséges, annak ellenére, hogy több gyógyszer esetében még nincs klinikai bizonyíték azok hatékonyságáról *S. maltophilia* fertőzésben. További problémát jelent, hogy az európai ajánlás csak az SXT-re vonatkozóan ad meg fajspecifikus klinikai érzékenységi határértéket. Kombinált antibiotikum terápia válhat szükségessé súlyosan immunkompromittált betegek és cisztás fibrózisban szenvedő (CF) betegek esetében, a beteg SXT intoleranciája esetén, illetve SXT-re rezisztens, vagyis definíció szerint multidrog rezisztens (MDR) *S. maltophilia* okozta fertőzésekben. Az opportunista fertőzésre fogékony betegek (immunkompromittáltak, daganatos betegek, hosszas intenzív terápiás kezelésre szoruló, stb.) számának emelkedése és a széles spektrumú antibiotikumok, ezen belül is a karbapenemek – melyek ellen a *S. maltophilia* természetes rezisztenciával bír – szükségszerűen egyre gyakoribb alkalmazása egyaránt a *S. maltophilia* infekciók számának növekedéséhez vezetett. A baktérium jellemzői, mint a biofilm képző képessége, ubiquiter természete, természetes és szerzett rezisztenciája egyaránt hozzájárulnak ahhoz, hogy napjaink egyik fenyegető, alkalmasint komoly terápiás kihívást jelentő kórokozóját jelentse. A

fertőzések magas letalitása (14-69%) a *S. maltophilia* klinikai jelentőségét kiemeli. Dolgozatom célja, hogy bemutassa e régóta ismert, de még mindig újdonságokat rejtő és globálisan egyre nagyobb problémát jelentő baktérium klinikai mikrobiológiáját, különös tekintettel az antibiotikum kezelés lehetőségeire.

2. Célkitűzések

A Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratóriumában a rutin vizsgálatok során izolálásra került *S. maltophilia* törzsek vizsgálatával a következő kérdésekre kerestünk választ.

1. Milyen a klinikai *S. maltophilia* izolátumok érzékenysége az elsőként választandó SXT-re és a másodvonalbeli antibiotikumokra?
2. Milyen a *S. maltophilia* törzsek klinikai háttere?
 - a. Kolonizáló vagy kórokozó volt a baktérium a betegekben?
 - b. Milyen volt a fertőzés kimenetele?
 - c. Milyen tényezők voltak befolyással a fertőzés kimenetelére?
3. Mekkora a *S. maltophilia* ko-kolonizáció vagy ko-infekció gyakorisága?
4. Milyen az SXT-rezisztens *S. maltophilia* törzsek antibiotikum érzékenysége és mi áll az SXT rezisztencia hátterében?
5. Van-e *in vitro* hatékony antibiotikum kombináció extrém rezisztens *S. maltophilia* izolátumok ellen?
6. Milyen a colistin+SXT kombináció *in vitro* hatékonysága a ko-infekciókból együttesen izolált *S. maltophilia*, MDR *P. aeruginosa* és MDR *A. baumannii* törzsekre?

3. Módszerek

3.1. A baktérium törzsek identifikálása és gyűjtése

A vizsgálat első részét 160 *S. maltophilia* törzsről végeztük, melyek 2009-2011 között különböző betegek mintáiból kerültek izolálásra. Ha egy betegnek több mintájából is tenyésztett *S. maltophilia*, akkor az első relevánsnak (a minta típusa alapján valószínűleg kórokozó) vélt izolátumot vontuk vizsgálatunk alá. Az SXT rezisztens törzsek vizsgálatához azon összesen 30, különböző *S. maltophilia*

izolátumot használtuk, melyek a 2010-2014 periódusban a Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratóriumában kerültek izolálásra. Az izolátumok identifikálása hagyományos identifikálási módszerek (OF próba, oxidáz próba, kataláz próba) mellett a VITEK 2 identifikáló automata (bioMérieux) Gram-negatív baktériumokat identifikáló kártyájával, majd mátrix asszisztált lézer deszorpció ionizációs, repülési idő (MALDI-TOF) tömegspektrometriával (Bruker Daltonics) történt. Minden izolátumot a vizsgálatok elvégzéséig 30% glicerin tartalmú agy-szív táplevesben, -20°C-on tároltunk. A korábban biokémiai módszerrel identifikált törzsek újra vizsgálatra kerültek MALDI-TOF MS technikával. A MALDI-TOF MS identifikáláshoz a direkt módszert (a baktérium izolátum target lemezre történő felvitele, majd 1 µl mátrix oldattal történő fedése) és a Bruker Biotyper 2.0 szoftvert használtuk. A mátrix oldat 5 mg α-cyano-4-OH-fahéjsavat tartalmazott egy milliliter oldószerben, melyet víz, acetonitril és trifluoroecetsav 4,75:5:0,25 arányú elegye adott. A tömegspektrométer paramétereinek alapbeállításain (ion forrás1 20kV, ion forrás2 18,5 kV, lencsék 8,5 kV, detektor 2,65 V, kapuzás nincs, pozitív lineáris mód, spektrumok detektálása 2000-20000 Da tartományban, maximum lézer frekvencia) nem változtattunk. Az identifikálás eredménye ≥ 2.0 score esetén került validálásra. A szoftver által megadott „*Stenotrophomonas maltophilia*”, „*Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas beteli)*”, „*Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas hibiscicola)*” és „*Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas geniculata)*” eredményeket egyaránt elfogadtuk.

A klinikai adatok retrospektív módon, a zárójelentések és laboratóriumi leletek (a fehérvérsejt szám, C-reaktív protein (CRP) és procalcitonin értékek) áttekintésével kerültek összegyűjtésre. A zárójelentésben megadott klinikai diagnózis alapján az izolátumokat két csoportra osztottuk: az infekciót okozó kórokozók és a kolonizálók csoportjára. Az infekció klinikai diagnózis volt. Kolonizálóknak tekintettük a *S. maltophilia* izolátumot, ha annak jelenléte a bőrön, a nyálkahártyán, a sebben vagy valamilyen excretumban klinikai tünetet nem okozott, arról a zárójelentésben nem vagy kolonizációként nyilatkoztak róla.

Az alsó légúti eredetű *S. maltophilia* izolátumok 58%-a ko-kolonizáló vagy ko-patogén baktériumok mellett került azonosításra az alsó légúti mintákban a 2013-2014 közötti periódusban. A *P. aeruginosa* volt a leggyakoribb ko-patogén. Azon minták kerültek kiválasztásra vizsgálatainkhoz, melyekben MDR *P. aeruginosa*,

MDR *A. baumannii* és *S. maltophilia* egyidejűleg fordult elő. A fenti időszakban összesen 20 különböző beteg alsó légúti mintájából kitenyésztett 20 x 3 izolátum állt rendelkezésünkre.

3.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az antibiotikumok minimális inhibitoros koncentráció (MIC) értékeit mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg, a CLSI metodikai ajánlásának megfelelően. A vizsgálathoz kationnal kiegészített Mueller-Hinton levest (Becton Dickinson) és 96 mélyedést tartalmazó mikrotiter lemezeket (TOMTEC) használtunk. Az SXT-t (Sigma-Aldrich) 0,25-128 mg/l, a ciprofloxacint (Fresenius Kabi) 0,5-256 mg/l, a moxifloxacint (Bayer Pharma) 0,064-32 mg/l, a levofloxacint (TEVA) 0,064-32 mg/l, a colistin (colistin-szulfát, Sigma-Aldrich) 0,5-256 mg/l, a doxycyclint (Pfizer) 0,064-32 mg/l és a tigecyclint (Wyeth) 0,064-32 mg/l koncentráció tartományában vizsgáltuk. Az infekciót okozó izolátumok esetében agar hígítási módszerrel is meghatároztuk az SXT és fluorokinolon MIC értékeket és grádiens diffúziós módszerrel (bioMérieux Etest[®] és Liofilchem) az SXT, fluorokinolon, tigecyclin és colistin MIC értékeket.

Az SXT rezisztens izolátumok esetében a vizsgált antibiotikumok sorát kiegészítettük ceftazidimmal (Fresenius Kabi) 1-512 mg/l és kloramfenikollal (Sigma-Aldrich) 0,5-256 mg/l koncentráció tartományban, az SXT és a colistin vizsgált tartományát pedig egy hígítási lépéssel megemeltük (0,5-256mg/l- és 1-512 mg/l-re). A ko-infekciókból származó *P. aeruginosa* törzseket 0,06-32 mg/l colistin és 2-1024 mg/l SXT, az *A. baumannii* törzseket 0,06-32 mg/l colistin és 0,5-256 mg/l SXT koncentráció tartományban vizsgáltuk.

A MIC értékek interpretálásához az EUCAST ajánlását használtuk. Az SXT esetében az EUCAST *S. maltophilia* specifikus, a fluorokinolonok és a tigecyclin esetén az EUCAST nem-fajspecifikus határértékeit alkalmaztuk. Doxycyclin esetében – *S. maltophilia* specifikus és nem-fajspecifikus határértékek hiányában – a *S. maltophilia* epidemiológiai vágóértékét (ECOFF) használtuk (8mg/l). Colistin esetében még ECOFF érték sincs megállapítva, ezért a *Pseudomonas* spp. specifikus 4 mg/l határérték alapján (EUCAST klinikai határértékek 4.1. verziója) interpretáltuk az eredményeket. Kloramfenikol esetében az EUCAST sem ECOFF értéket, sem nem fajspecifikus határértéket nem adott ki, ezért a CLSI *S. maltophilia* specifikus

határértékeit használtuk. Kontrollként az *Escherichia coli* ATCC 25922, a *P. aeruginosa* ATCC 27853 és a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 törzseket használtuk.

3.3. Antibiotikum kombinációk vizsgálata

Az SXT-rezisztens törzsek közül az extrém rezisztensek (n=4) *in vitro* érzékenységét vizsgáltuk 20 különböző antibiotikum kombinációra. Az antibiotikum kombinációk vizsgálatát checkerboard (CB) módszerrel vizsgáltuk, 96 mélyedést tartalmazó lemezen. A ceftazidimot ciprofloxacinnal, levofloxaccinnal, moxifloxaccinnal, tigecyclinnel, doxycyclinnel, colistinrel és SXT-vel kombinálva vizsgáltuk. A colistin hatását ciprofloxacinnal, levofloxaccinnal, moxifloxaccinnal és SXT mellett teszteltük. A tigecyclint a három előbbi fluorokinolonnal, colistinrel és SXT-vel kombinálva, az SXT-t pedig a fluorokinolonokkal kombinálva vizsgáltuk. A vizsgálathoz a mélyedésenként 100 µl végtérfogatban antibiotikumokat tartalmazó Mueller-Hinton táplevesbe annyi baktériumot inokuláltunk, hogy az 5×10^5 telepképző egység (CFU)/ml mennyiségű legyen. A lemezeket 35°C-on 18-22 órán át inkubáltuk. Szinergén hatást detektálva az eredményt kombinált E-test® módszerrel confirmáltuk. A kettős korong diffúziós módszert szűrő módszerként kíséreltük meg használni, a korongokat 1 cm távolságra helyezve egymástól.

A frakcionális inhibitoros koncentráció indexek összegének ($\Sigma FICI$) kiszámítása a következő képlettel történt: (az A antibiotikum B antibiotikum mellett mért MIC értéke)/(az A antibiotikum MIC értéke) + (a B antibiotikum A antibiotikum mellett mért MIC értéke)/(az B antibiotikum MIC értéke). Antagonista hatást $\Sigma FICI > 4$, indifferens hatást $0,5 = \Sigma FICI \leq 4$ és szinergén hatást $\Sigma FICI < 0,5$ esetén állapítottunk meg. A $0,5 = \Sigma FICI \leq 1$ tartomány parciális szinergén, additív hatásként is definiálható. Az antibiotikum kombinációk eredményeinek interpretálására az érzékenységi határérték indexet (SBPI) is használtuk. Kiszámítása a következő képlettel történt: (az A antibiotikum érzékenységi határértéke)/(az A antibiotikum B antibiotikum mellett mért MIC értéke) + (a B antibiotikum érzékenységi határértéke)/(a B antibiotikum A antibiotikum mellett mért MIC értéke). Ha az SBPI ≥ 2 , akkor a két antibiotikum kombinációban mért MIC értékei vagy megegyeznek az érzékenységi határértékükkel vagy az egyik antibiotikum MIC értéke a kombinációban

alacsonyabb, mint az érzékenységi határérték. Minél nagyobb az SBPI, annál hatékonyabb az antibiotikum kombináció.

A colistin+SXT kombinációt az egyidejűleg izolált baktérium hármasokon először CB módszerrel végeztük. A *S. maltophilia* izolátumokat a colistin hét -, az SXT tizenegy felező hígítási fokában, míg a *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzseket az SXT hét -, és a colistin tizenegy felező hígítási fokában vizsgáltuk. Azon törzseket, melyekre a kombináció CB teszttel szinergén hatást mutatott, tovább vizsgáltuk idő-ölés teszttel (TKA). Ha a MIC érték az elérhető szérum szint felett volt, akkor az SXT-t 8 mg/l, a colistint 4 mg/l koncentrációban használtuk. E koncentrációk megfelelnek a szérumban mérhető koncentrációknak. A vizsgálathoz colistint, SXT-t és colistin+SXT kombinációt tartalmazó Mueller-Hinton táplevest használtunk, 20 ml térfogatban. A táplevesbe inokulált baktériumok mennyisége 10^8 CFU/ml volt. A tenyészetet folyamatos mozgatás mellett 37°C-on inkubáltuk. A csíraszám meghatározáshoz egy, kettő, négy, hat és 24 óra inkubáció után vettünk mintát a tenyészetből. A tenyészetet fiziológiás sóoldatban hígítottuk ($10^{-1} - 10^{-6}$) és véres agar lemezekre (bioMérieux) oltottuk. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk 24 órán át. Ezt követően határoztuk meg a telepek számát. A detektálás alsó határa 20 CFU/ml volt. Szinergén hatást állapítottunk meg, ha a $CFU \geq 2 \log_{10}$ mértékkel csökkent a colistin+SXT kombináció hatására, a *S. maltophilia* esetében az SXT mellett, a *P. aeruginosa* és az *A. baumannii* esetében a colistin mellett észlelt CFU számhoz képest.

3.4. Molekuláris vizsgálatok

Az izolátumok genetikai összefüggőségét enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) módszerrel vizsgáltuk. A DNS izoláláshoz a baktériumokat 100 µl PCR tisztaságú vízben szuszpendáltuk, majd 15 percig 100°C-on tartottuk. A szuszpenziót 12000 rpm fordulatszámon két percig centrifugáltuk. A felülúszó 1-1 µl-ét használtuk a PCR vizsgálatokhoz. Az ERIC1 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' és ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTG AGCG-3' primereket (Bio Basic Inc.) és a REDTaq Ready Mix PCR reagenst (Sigma Aldrich) használtuk a PCR-hez, 50 µl végtérfogatban. A PCR program 95°C 2 perc, majd 30 ciklus 90°C 30 másodperc, 52°C 1 perc, 65°C 8 perc szakaszból állt. A gélelektroforézist 0,01% GelRed (Biotium) festéket tartalmazó 1,5%-os agaróz

(Sigma Aldrich) gélben, Tris-bórsav-EDTA pufferben (Sigma Aldrich) végeztük. Az egy osztályról származó izolátumokat ugyanazon PCR amplifikációban és gélelektroforézisben vizsgáltuk. A sávmintázatot szabad szemmel értékeltük. Azon izolátumokat tekintettük egymástól függetlennek, melyek egymástól legalább két sávban eltérést mutattak.

Az SXT rezisztenciáért felelős *sul1* gén jelenlétét a F 5'-ATGGTGACGGTGTTTCGGCATTCTGA-3' és R 5'-CTAGGCATGATCTAAC CCTCGGTCT-3' primerekkel, a *sul2* génét a F 5'-GAATAAATCGCTCATCATT TTCGG-3' és R 5'-CGAATTCTTGCGGTTTCTTTCAGC-3' primerekkel vizsgáltuk. A PCR vizsgálat 1 x 95°C 10 perc, 30 x 94°C 45 másodperc, 64°C 45 másodperc, 72°C 2 perc, 1 x 72°C 10 perc paraméterekkel történt. A class 1 integron kimutatásához az F 5'-CAACACATGCGTGTAAT-3' és R 5'-CTTGCTGC TTGGATGCC-3' primereket használtuk. A PCR anellációs hőmérséklete ez esetben 55°C volt, a többi paraméter megegyezett a fent leírtakkal.

3.5. Statisztikai elemzés

A *S. maltophilia* fertőzésben szenvedő betegek egyes klinikai jellemzőinek a letalitással való összefüggését vizsgáltuk. Az egyváltozós analízishez χ^2 tesztet és Fisher tesztet használtunk. A $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikancia szintnek. Az egyváltozós analízis alapján a halálózással szignifikánsan összefüggő változókat tovább vizsgáltuk többváltozós logisztikus regressziós modellben, hogy a letalitással függetlenül összefüggő változókat azonosítsuk. A 95% konfidencia intervallumhoz (95% CI) tartozó odds ratio (OR) érték minden változó esetében kiszámításra került. Ezen vizsgálat esetében is a $p < 0,05$ értéket fogadtuk el szignifikancia szintnek. A statisztikai vizsgálatok Stata 12 szoftverrel (StataCop LP, USA) történtek.

4. Eredmények

A MALDI-TOF MS vizsgálat eredménye alapján az izolátumok 74%-a *S. maltophilia*, 16%-a *S. maltophilia* (*P. hibiscicola*), 7%-a *S. maltophilia* (*P. beteli*), 3% *S. maltophilia* (*P. geniculata*) volt. A *P. hibiscicola*, *P. beteli* és *P. geniculata* egyaránt a *Stenotrophomonas* rRNS törzságba tartoznak, a *Stenotrophomonas* genusba taxonómiai átsorolásra kerültek, ma a *S. maltophilia* szinonimáinak tekinthetők.

A klinikai adatok alapján 100 betegnek volt *S. maltophilia* fertőzése. Esetükben vérből (n=25), bronchoalveolaris lavage (BAL) mintából (n=30), trachea aspirátumból (n=31), köpetből (n=7), centrális vénás kanülből (n=4), peritoneális folyadékából (n=3) tenyésztett ki a kórokozó. Hatvan beteg esetében a *S. maltophilia* kolonizálóként volt jelen a perianális törlet (n=11), vizelet (n=8), fül- (n=6), torok- (n=3), orr- (n=4), szem törlet (n=7), katéter (n=1), köpet (n=7), trachea aspirátum (n=7) és seb (n=6) mintáikban. Az SXT-rezisztens *S. maltophilia* törzsekből (n=30) 2 hemokultúrából, 8 BAL mintából, 3 trachea aspirátumból, 3 köpetből, 3 tracheális tubusból, 1 vizeletből, 7 perianális -, 2 torok - és 1 fül törletből került izolálásra. Ezen izolátumok többségét (n=23) kolonizálóként vagy kontaminánsként értékelték. Hét izolátum volt alsó légúti fertőzés vagy véráram fertőzés kórokozója. Tizenhárom törzs neonatális, hat felnőtt intenzív osztályon kezelt beteg mintáiból tenyésztett ki.

4.1. Genetikai összefüggőség vizsgálatának eredményei

Az ERIC-PCR vizsgálattal a kórokozó és kolonizáló baktériumok csoportjában is találtunk megegyező sávmintázattal bírót. A kolonizáló izolátumok csoportjában két-két izolátum azonos mintázatát négy esetben, három-három izolátum azonos mintázatát három esetben fedeztük fel. A kórokozó izolátumok csoportjában tizenkét megegyező mintázat fordult elő (6 x 2 izolátum, 4 x 3 izolátum 1 x 5 izolátum és 1 x 6 izolátum között). A genetikailag összefüggő izolátumok közül a kolonizáló csoportból 10, a kórokozó csoportból 23 izolátumot kizártunk az antibiotikum érzékenységi eredmények értékelésekor, hogy elkerüljük az azonos ERIC-PCR genotípusú törzsek esetleges torzító hatását.

Az SXT rezisztens törzsek körében négy azonos mintázatot találtunk (2 x 2 izolátum, 1 x 3 izolátum és 1 x 9 izolátum között). Az azonos mintázatú törzsek MIC értékeikben lényegesen különböztek egymástól. Ezt és az SXT-rezisztens csoport kis elemszámát figyelembe véve az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredményeinek értékelésekor mind a harminc törzs adatait számításba vettük.

4.2. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei

A mikrodilúcióval, agar hígítási módszerrel és gradiens diffúziós teszttel kapott eredmények összhangban voltak. A különböző ERIC-PCR mintázatú törzsek (77 kórokozó és 50 kolonizáló baktérium) MIC₅₀ és MIC₉₀ értékeiket, a MIC

tartományokat és az interpretálás eredményét a 1. táblázat foglalja össze. Magyarországon minocyclin nincs forgalomban (egyedi importtal beszerezhető), ezért helyette a doxycyclin *in vitro* hatását vizsgáltuk. Az ECOFF alatti MIC értékeket érzékenyként interpretálva az összes izolátum doxycyclinre érzékenynek bizonyult. A 160 izolátumot elemezve, a genetikai összefüggőség figyelmen kívül hagyása nélkül, szignifikáns eltérés a táblázatban megadottakhoz képest nem mutatkozott. Összehasonlítottuk a kórokozó és kolonizáló izolátumok antibiotikum érzékenységét. Mindkét csoport nagy százalékban érzékeny volt SXT-re. A kórokozók csoportjában, a ciprofloxacinnal kivételével, magasabb volt az antibiotikumra nem-érzékeny izolátumok aránya, mint a kolonizálók között. A colistin és tigecyclin nem-érzékeny törzsek száma 1,2-1,3-szor több volt a kórokozók esetében.

1. táblázat: A 127 különböző ERIC-PCR mintázatú *S. maltophilia* törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatának eredménye. A kórokozó törzsek száma 77, a kolonizáló törzsek száma 50. M. érzékeny: mérsékelten érzékeny.

Antibiotikum Határértékek (mg/l)	Izolátumok	MIC (mg/l)			Izolátumok %-a		
		MIC tartomány	MIC50	MIC90	Rezisztens	M. érzékeny	Érzékeny
SXT	kórokozó	<0,25->32	0,25	1	1	0	99
É≤4 , R>4	kolonizáló	<0,25->32	0,5	1	2	0	98
ciprofloxacinn	kórokozó	<0,5-64	2	8	54	22	24
É≤0,5 , R>1	kolonizáló	0,5-128	2	8	76	12	12
levofloxacin	kórokozó	0,125-16	1	2	7	18	75
É≤1 , R>2	kolonizáló	<0,064-4	0,5	2	4	12	84
moxifloxacin	kórokozó	<0,064-8	0,25	1	7	6	87
É≤0,5 , R>1	kolonizáló	<0,064-4	0,125	0,5	4	6	90
doxycyclin	kórokozó	0,125-4	1	2	0	0	100
ECOFF 8 mg/l	kolonizáló	0,125-4	1	2	0	0	100
tigecyclin	kórokozó	0,125-16	0,5	2	50	38	12
É≤0,25 , R>0,5	kolonizáló	0,125-16	0,5	2	14	51	35
colistin	kórokozó	1->256	64	>256	91	0	9
É≤4 , R>4	kolonizáló	0,25->128	16	>128	77	0	23

A SXT-rezisztens törzsek antibiotikum érzékenységi eredményeit a 2. táblázat mutatja be. Az SXT MIC értékek a rezisztens tartományon belül szélesesen, 8-128 mg/l között oszlottak el. A csoport egy tagja sem mutatott érzékenységet ciprofloxacinnal, tigecyclinnal, ceftazidimmal és colistinnal. A törzsek 37%-a volt érzékeny levofloxacinra vagy moxifloxacinra. Az ECOFF alatti MIC értékeket

érzékenyként interpretálva a törzsek 50%-a doxycyclinre érzékenynek bizonyult. Az izolátumok 13%-a volt kloramfenikol érzékeny. Két izolátum volt, mely minden vizsgált antibiotikummal szemben rezisztenciát mutatott. Két további csak doxycyclinre bizonyult érzékenynek. Ezen négy izolátumon végeztük el a 20 különböző antibiotikum kombináció vizsgálatát.

2. táblázat: A SXT-rezisztens *S. maltophilia* törzsek antibiotikum érzékenységi eredményei. A törzsek száma 30. M. érzékeny: mérsékelten érzékeny.

Antibiotikum Határértékek (mg/l)	MIC (mg/l)			Izolátumok %-a		
	MIC tartomány	MIC50	MIC90	Rezisztens	M. érzékeny	Érzékeny
SXT : $\hat{E} \leq 4$, $R > 4$	8-128	32	64	100	0	0
ciprofloxacín : $\hat{E} \leq 0,5$, $R > 1$	1-32	4	16	83	17	0
levofloxacín : $\hat{E} \leq 1$, $R > 2$	0,5-16	2	8	20	43	37
moxifloxacín : $\hat{E} \leq 0,5$, $R > 1$	0,125-8	1	4	23	40	37
doxycyclin : ECOFF 8 mg/l	0,5-64	4	16	33	17	50
tigecyclin : $\hat{E} \leq 0,25$, $R > 0,5$	0,5-8	2	4	97	3	0
ceftazidim : $\hat{E} \leq 4$, $R > 8$	16-512	128	512	100	0	0
colistin : $\hat{E} \leq 4$, $R > 4$	8->512	128	>512	100	0	0
kloramfenikol : $\hat{E} \leq 8$, $R \geq 32$	8-64	16	32	44	43	13

A 2009-2017 közötti időszakban saját adataink szerint az SXT rezisztens törzsek aránya nem változott. Évente 4-12 volt azon beteg száma, akiknek mintáiból MDR *S. maltophilia* tenyésztett. A teljes kilenc éves periódusban összesen 81 különböző SXT-rezisztens *S. maltophilia* került izolálásra, az összesített rezisztencia ráta 1,9% volt. A stagnáló 2% körüli rezisztencia biztató tény, mely szerint sem hatékony szelektációs nyomás nem érvényesül, sem MDR klón vagy mobil genetikai elem effektíven nem terjed.

A *S. maltophilia* mellett izolált valamennyi *P. aeruginosa* és *A. baumannii* colistin érzékeny volt, MIC50 1 mg/l és MIC90 2 mg/l értékekkel. Az *A. baumannii* törzsek 15%-a volt SXT érzékeny (MIC50 32 mg/l, MIC90 128 mg/l). A *P. aeruginosa* törzsek mutatták magas fokú természetes SXT rezisztenciájukat (MIC50 256 mg/l, MIC90 512 mg/l). A ko-kultúrák *S. maltophilia* tagjai SXT érzékenyek (MIC50 0,25 mg/l és MIC90 1 mg/l) és colistinnel szemben rezisztensek (MIC50 256 mg/l és MIC90 > 512 mg/l) voltak.

4.3. Antibiotikum kombinációk vizsgálatának eredményei

Az extrém rezisztens *S. maltophilia* törzsekkel (n=4) végzett CB vizsgálat alapján (a Σ FICI értékeket a legalacsonyabbnak talált MIC értékekkel kiszámítva) a legtöbb kombináció indifferens hatást mutatott. Antagonista hatást nem találtunk. Szinergén hatást a következő kombinációkban találtunk, legalább egy izolátum esetében: ceftazidim+ciprofloxacín, ceftazidim+moxifloxacín, ceftazidim+levofloxacín, ceftazidim+colistin, colistin+ciprofloxacín, colistin+moxifloxacín, colistin+levofloxacín, colistin+doxycyclin, tigecyclin+colistin, SXT+moxifloxacín, SXT+levofloxacín. A ceftazidim+moxifloxacín és a ceftazidim+colistin volt az a két kombináció, mely mindegyik izolátum esetében Σ FICI \leq 0,5 értékekkel szinergén vagy parciálisan szinergén hatású volt.

A vizsgálati eredmények interpretálásakor az antibiotikumok elérhető szérumszintjét is figyelembe kell venni. A csúcskoncentrációk a következők: ceftazidim 60 mg/l, ciprofloxacín 1,8-4,6 mg/l, levofloxacín 5,7-8,6 mg/l, moxifloxacín 4,5 mg/l, colistin 5-7,5 mg/l, SXT 1-2/40-60 – 9/105 mg/l, tigecyclin 0,63 mg/l, doxycyclin 1,5-201 mg/l, kloramfenikol 11-18 mg/l. A szérumszinteket figyelembe véve csak a ceftazidim+fluorokinolon és colistin+fluorokinolon kombinációk szinergén hatása fogadható el interpretációra alkalmasnak. Ha az EUCAST érzékenységi határértékeit is figyelembe vesszük, akkor csak a fluorokinolonok ceftazimmal kombinált MIC értékei ($SBPI_{CAZ+MOXI} = 2,125$, $SBPI_{CAZ+LEV} = 4,125$) és a colistin moxifloxacinnal kombinált MIC értéke ($SBPI_{COL+MOXI} = 2,125$) süllyedt az érzékenységi tartományba és csak egy-egy izolátum esetében.

A *S. maltophilia*, MDR *P. aeruginosa* és MDR *A. baumannii* hármasokkal végzett CB vizsgálatok eredményei szerint a colistin+SXT kombinációnak antagonista hatása nincs. A *S. maltophilia* törzsek 50%-ánál, a *P. aeruginosa* törzsek 35%-ánál, az *A. baumannii* törzsek 45%-ánál a kombináció szinergén hatásának mutatkozott.

A TKA módszerrel kapott eredményeket az 3. táblázat foglalja össze. A előzetes CB vizsgálattal detektált szinergén hatás alapján kiválogatott *S. maltophilia* törzsek 70%-ánál (10-ből 7 esetben), *P. aeruginosa* törzsek 57%-ánál (7-ből 4 esetben) és *A. baumannii* törzsek 56%-ánál (9-ből 5 esetben) sikerült TKA-val is igazolni a colistin+SXT szinergén hatását.

Ahogy a legtöbb Gram-negatív baktériumok ellen ható colistin tartalmazó antibiotikum kombináció esetében, ez esetben is megfigyelhető volt, hogy a kezdeti, 6 órán belüli gátló hatás igen kifejezett, amit 24 óra elteltével jelentős visszanovekedés követ. Az inkubáció első 6 órája után a *S. maltophilia* törzsek 86%-ánál, a *P. aeruginosa* törzsek 50%-ánál mutatkozott a colistin+SXT szinergén hatása. Az *A. baumannii* törzseknél a szinergén hatás a 24. óra után kifejezettebben mutatkozott. A CB és TKA módszerrel kapott eredmények 61%-ban korreláltak egymással, de a Σ FICI értékek és a CFU csökkenés közt összefüggés nem volt. Hét *S. maltophilia* (35%), négy *P. aeruginosa* (20%) és öt *A. baumannii* (25%) törzs esetén mindkét módszer alapján szinergén hatású volt a kombináció. Összesen két beteg hármás baktériumcsoportján érvényesült a szinergia.

3. táblázat: A TKA vizsgálat alapján szinergén hatású colistin+SXT kombináció eredményei az egyes törzseken és azok előző CB vizsgálatl kapott Σ FICI értékei. A csíraszám csökkenést *S. maltophilia* esetén az SXT mellett, *P. aeruginosa* és *A.baumannii* esetében a colistin mellett mért csíraszámhoz képest állapítottuk meg.

colistin+SXT	szinergén hatás n (%)	log10 csökkenés 6 óra elteltével	log10 csökkenés 24 óra elteltével	előző CB vizsgálatl kapott Σ FICI érték
<i>S. maltophilia</i>	7 (70)	5,9	2,4	Sm#1 Σ FICI=0,375
		7,7	3,8	Sm#3 Σ FICI=0,265
		7,5	3,9	Sm#6 Σ FICI=0,281
		2,4	4,7	Sm#7 Σ FICI=0,375
		2,7	2,9	Sm#9 Σ FICI=0,312
		6,3	3,1	Sm#10 Σ FICI=0,187
		6	6	Sm#20 Σ FICI=0,125
<i>P. aeruginosa</i>	4 (57)	7	4,2	Pa#1 Σ FICI=0,375
		3,4	2,3	Pa#5 Σ FICI=0,156
		6,7	4,1	Pa#14 Σ FICI=0,375
		7,2	3,7	Pa#18 Σ FICI=0,266
<i>A. baumannii</i>	5 (56)	3,1	7,3	Ab#2 Σ FICI=0,25
		3,3	5,3	Ab#4 Σ FICI=0,094
		3,1	7,3	Ab#6 Σ FICI=0,375
		2,7	4,8	Ab#11 Σ FICI=0,375
		3,6	5,5	Ab#12 Σ FICI=0,375

4.4. Rezisztencia gének vizsgálatának eredménye

A rezisztencia gének vizsgálatát 27 törzsön végeztük el. (Három SXT rezisztens izolátum a tárolás során elpusztult.) A *sul1* gént 25 törzsben, a *sul2*-t két törzsben detektáltuk. Mindkét gént egy törzs sem volt pozitív. Hét törzs (23%) hordozott class 1 integront, az integráz-specifikus primerekkel végzett PCR vizsgálat alapján.

4.5. A klinikai adatok elemzésének eredményei

A 100 kórokozó izolátum klinikai hátterének elemzésére került sor. A törzsek 70%-a intenzív osztályon kezelt betegek mintáiból került izolálásra. A betegek 62%-ának pneumóniája volt, 12 esetben légzési elégtelenséggel. Szepszis 46 betegnél alakult ki, 23 esetben a septicus sokk vagy több szervi elégtelenség súlyosságát elérve. A septicus esetekből a *S. maltophilia* 12 esetben lett megnevezve etiológiai ágensként. Alapbetegségként krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) 19 betegnél, malignus daganat szintén 19 betegnél állt fenn. Kilenc beteg volt immunszuppresszált, közülük hárman tüdőtranszplantáltak. A klinikai adatokat és azok halálozással való összefüggését a 4. táblázat mutatja be.

A teljes, kórházon belüli halálozási ráta 45% volt. A fatális esetek 25%-ában a *S. maltophilia* fertőzésnek közvetlen szerepe volt a halálozásban. Húsz beteg egyéb baktériumok ellen hatékony antibiotikum terápiát kapott, de a *S. maltophilia* ellen is hatékonyat nem. Közülük 13 beteg meghalt. A 11 colistinrel kezelt beteg közül kilencen meghaltak. A 29 SXT-vel kezelt beteg közül heten hunytak el. Hat beteg kapott ciprofloxacint (5 beteg meghalt), 17 beteg moxifloxacint (3 beteg meghalt), 16 beteg levofloxacint (7 beteg meghalt) és egy beteg tigecyclin kezelést (elhunyt).

A halálozás szignifikáns összefüggést mutatott az intenzív terápiás kezeléssel, a gépi lélegeztetéssel, a vazopresszor terápiával, a sokszervi elégtelenséggel (MOF) és a centrális vénás kanül viseléssel. Kor és nem szerinti korrekció után is szignifikáns maradt a változók összefüggése a halálozással. A logisztikus regresszióval végzett többváltozós analízis alapján a változók közül kettő: a centrális vénás kanül viselés (OR: 0,15, 95% CI: 0,03-0,59, $p=0,007$) és a centrális kanül mellett alkalmazott vazopresszor terápia (OR: 0,23, 95% CI: 0,08-0,65, $p=0,006$) bizonyult a letalitás független rizikófaktorának.

4. táblázat: A 100 kórokozó *S. maltophilia* törzs klinikai adatainak összefoglalása, predisponáló tényezők szerint. A p értékek meghatározása χ^2 teszttel vagy Fisher teszttel történt. A p <0,05 értékek vannak kiemelve.

	Meghalt (n=45) n (%)	Gyógyult (n=55) n (%)	p érték
Kor (év) medián (tartomány)	67 (0-88)	62 (0-88)	-
Férfi	23 (51,1)	35 (63,6)	0,29
Malignus hematológiai betegség	3 (6,6)	3 (5,4)	0,31
Előrehaladott malignus szolid tumoros betegség	10 (22,2)	8 (14,5)	0,54
Diabetes mellitus	16 (35,5)	16 (29,1)	0,22
Szteroid terápia	4 (8,8)	8 (14,5)	0,31
Kemoterápia	4 (8,8)	11 (20)	0,2
Neutropenia (<0,5 G/l)	5 (11,1)	2 (3,6)	0,24
Traszplantáción átesett	0	5 (9,1)	-
Krónikus szívbetegség	15 (33,3)	18 (32,7)	0,88
Krónikus vesebetegség, hemodialízis	10 (22,2)	5 (9,1)	0,12
Krónikus tüdőbetegség	13 (28,8)	14 (25,4)	0,87
Krónikus májbetegség	5 (11,1)	7 (12,7)	0,95
Hipertónia	30 (66,6)	25 (45,4)	0,05
Intenzív terápiás ellátás	43 (95,5)	32 (58,2)	0,00005
Vazopresszor terápia	26 (57,7)	8 (14,5)	0,00001
Centrális vénás katéter viselés	42 (93,3)	29 (52,7)	0,00001
Gépi lélegeztetés	41 (91,1)	28 (50,9)	0,00004
Súlyos szepszis, szeptikus sokk, MOF	23 (51,1)	5 (9,1)	0,00001
Nem <i>S. maltophilia</i> véráram fertőzés	15 (33,3)	9 (16,3)	0,08
<i>S. maltophilia</i> véráram fertőzés	12 (26,6)	13 (23,6)	0,9
Műtét a megelőző egy hónapban	18 (40)	12 (21,8)	0,08
Polimikróbás fertőzés	35 (77,7)	33 (60)	0,09

A *S. maltophilia* fertőzött betegek fehérvérsejt szám értékei 0,05-37,7 G/l között változtak, 11,2 G/l medián értékkel. A CRP értékek 0,4-423 mg/l (medián 86 mg/l), míg a prokalcitonin értékek 0,15-100 µg/l (medián 1,6 µg/l) között változtak. A laboratóriumi értékeket a mikrobiológiai vizsgálathoz való mintavétel időpontjában levett vérmintákból mérték. Ha a mintavétel napján nem volt a betegnek fehérvérsejt szám, CRP vagy prokalcitonin eredménye, akkor a mintavétel előtti legközelebbi időpontban (legfeljebb két napon belül) mért értékek kerültek a vizsgálatba.

A *S. maltophilia* mellett a minták 68%-ában egyéb kórokozó is azonosításra került. Ezen izolátumok számát és eloszlását az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat: A *S. maltophilia* törzsekkel egyidejűleg izolált mikrobák száma és eloszlása.

* *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas fluorescens*.

** *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*

Izolátumok	Kórokozók (n=100)	Kolonizálók (n=60)
	n	n
Gram-negatív baktériumok		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	7
egyéb nem fermentáló*	0	3
<i>Enterobacterales</i> **	17	13
Gram-pozítív baktériumok		
koaguláz-negatív <i>Staphylococcus spp.</i>	4	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	7
<i>Enterococcus spp.</i>	10	8
<i>Candida spp.</i>	36	6

5. Következtetések

1. Az SXT még mindig a leghatékonyabb antibiotikum a *S. maltophilia* ellen. A törzsek 98-99%-a érzékeny az elsőként választandó antibiotikumra. A moxifloxacinnal és levofloxacinnal szembeni rezisztencia aránya egyelőre alacsony, így ezen fluorokinolonok akár magas dóziszú monoterápiaként, még inkább kombinált antibiotikum terápia részeként alkalmazhatók. A doxycyclin kiváló *in vitro* hatékonyságúnak bizonyult. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján valószínű, hogy a minocyclin hasonló hatékonyságot mutatna *S. maltophilia* törzseink ellen. Részben az SXT rezisztens törzsek, részben a súlyos állapotú krónikus légúti beteg fertőzései, részben az CLSI ajánlása miatt indokolt lenne a minocyclin forgalmazása hazánkban. A colistinnek a *S. maltophiliára* nincs gátló hatása, monoterápiaként nem alkalmazható. A *S. maltophiliára* specifikus, európai klinikai határértékek megállapítása és az érzékenységi vizsgálatok egységes metodikájának deklarálása szükségszerű, a közeljövő sürgető feladata.

2. A legtöbb fertőzés alapbetegségeik miatt súlyos állapotú, intenzív terápiás kezelésre szoruló betegekben alakult ki. A vizsgálatunkban felderített magas, kórházi kezelés alatti össz halálozási ráta (45%) inkább a súlyos alapbetegségekkel volt összefüggésben, mintsem magával a *S. maltophilia* fertőzéssel. Ugyanakkor a fertőzéssel egyértelműen összefüggő 11%-os halálozási ráta is igen magas. Különösen az intenzív terápiás kezelésre szoruló betegek esetében kell számolni a *S. maltophilia* fertőzés veszélyével, ezért körükben a *S. maltophilia* kolonizáció szűrő vizsgálatokkal való felderítése indokolt. Külön figyelem kell, hogy irányuljon a centrális vénás kanült viselő betegekre, mivel az *S. maltophilia* fertőzésben a halálozás egyik rizikófaktora.

3. A klinikusoknak mérlegelniük kell, hogy a *S. maltophilia* kópatogénként vagy ko-kolonizálóként való jelenléte egy fertőzésben hatással lehet az antibiotikum terápia sikerére és a betegség kimenetelére. A leggyakoribb kópatogénnek talált *P. aeruginosa* esetében a *S. maltophilia* ronthatja a karbapenem, cefalosporin és aminoglikozid terápia hatékonyságát. A *S. maltophilia* a környező baktériumok virulenciáját növelni képes, ezért eradikálása még akkor is indokolt lehet, különös krónikus légúti betegségekben, ha az csak kolonizálóként van jelen a betegben.

4. Az SXT rezisztens, MDR *S. maltophilia* előfordulása egyelőre ritka. A rezisztenciát meghatározó *sul* gének mobil genetikai elemekhez való kapcsolódása miatt az SXT rezisztencia alakulásának folyamatos követése indokolt. Az MDR törzsek körében kimutatott magasabb antibiotikum rezisztencia klinikai konzekvenciával járó eredmény: a levofloxacin és moxifloxacin egyelőre terápiás alternatívát jelent MDR *S. maltophilia* fertőzésekben, de fluorokinolon rezisztencia esetében már csak egy-egy antibiotikum kombináció vagy a tetracyclin csoportba tartozó, a *S. maltophilia* fertőzések kezelésében egyelőre klinikai evidenciát nélkülöző antibiotikumok hatékonyságában lehet reménykedni.

5. A fluorokinolonokat, elsősorban a moxifloxacint tartalmazó kombinációk még abban az esetben is hatékonyak, ha az izolátum fluorokinolon rezisztenciát mutatott. A ceftazidim, melyre az MDR törzsek magas fokú rezisztenciát mutatnak, *in vitro* jelentősen növeli egyéb antibiotikumok hatékonyságát. Az inhalációs formában alkalmazható antibiotikumok intravénás antibiotikumokkal kombinálva még akkor is hatékonyak lehetnek, ha az *in vitro* szinergén hatás az SBPI

alaján nem igazolt. A kombinációs tesztek eredménye izolátum függő, így minden esetben a szóba jövő antibiotikum kombinációk egyedi vizsgálata szükséges.

6. A *S. maltophilia*, MDR *P. aeruginosa* és MDR *A. baumannii* ko-infekciókban a colistin+SXT kombináció az *in vitro* eredmények alapján hatékony terápia. A kombináció antagonista hatást nem mutatott, a törzsek 20-35%-ánál szinergén hatásúnak bizonyult. Az MDR *A. baumannii* esetén a colistin mellett észlelhető visszaövekedését gátolta.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Juhász E, Krizsán G, Lengyel G, Grósz G, Pongrácz J, Kristóf K. (2014) Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 13: 333.

Juhász E, Pongrácz J, Iván M, Kristóf Katalin. (2015) Antibiotic susceptibility testing of sulfamethoxazole-trimethoprim resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated at a tertiary care centre in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62: 295-305.

Juhász E, Kovács A, Iván M, Pongrácz J, Kristóf K. (2017) In vitro activity of colistin and trimethoprim/sulfamethoxazole against consortia of multidrug resistant non-fermenting Gram-negative bacilli isolated from lower respiratory tract. *Jund J Microbiol*, 10: e14034.

Juhász E, Iván M, Pongrácz J, Kristóf K. (2018) Ritkábban előforduló, alsó légúti fertőzést okozó Gram-negatív nem fermentáló pálcák. *Orv Hetil*, 159: 23-30.

Az értekezéstől független közlemények:

Sárvári P, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Melegh Sz, Latkóczy K, Urbán E. (2018) A multicentre survey of the antibiotic susceptibility of clinical *Bacteroides* species from Hungary. *Infect Dis*, 50: 372-380.

Sárvári P, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, Urbán E. (2017) Molecular characterization of multidrug resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist*, 13: 65-69.

Juhász E, Pintér E, Iván M, Pongrácz J, Kristóf K. (2017) Colistin resistance among blood culture isolates at a tertiary care centre in Hungary. *J Glob Antimicrob Resist*, 11: 167-170.

Adegathe J, Juhász E, Pongrácz J, Rimanóczy E, Kristóf K. (2016) Does *Staphylococcus saprophyticus* cause acute cystitis only in young females, or is there more to the story? A one-year comprehensive study done in Budapest, Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 63: 57-67.

Pongrácz J, Benedek K, Juhász E, Iván M, Kristóf K. (2016) In vitro biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: Any association with clinical characteristics? *J Med Microbiol*, 65: 272-277.

Pongrácz J, Juhász E, Iván M, Kristóf K. (2015) Significance of yeasts in bloodstream infection: epidemiology and predisposing factors of candidaemia in adult patients at a university hospital (2010-2014). *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62: 317-329.

Nagy E, Ábrók M, Bartha N, Bereczki L, Juhász E, Kardos G, Kristóf K, Miszti C, Urbán E. (2014) Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésen alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén. *Orv Hetil*, 155: 1495-1503.

Juhász E, Jánvári L, Tóth A, Damjanova I, Nobilis A, Kristóf K. (2012) Emergence of VIM-4- and SHV-12-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Int J Med Microbiol*, 302: 257-260.

Juhász E, Béres J, Kanizsai S, Nagy K. (2012) The Consequence of a Founder Effect: CCR5-Delta 32, CCR2-64I and SDF1-3 ' A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary. *Pathol Oncol Res*, 18: 177-182.

Guba Z, Hadadi E, Major A, Furka T, Juhász E, Koos J, Nagy K, Zeke T. (2011) HVS-I polymorphism screening of ancient human mitochondrial DNA provides evidence for N9a discontinuity and East Asian haplogroups in the Neolithic Hungary. *J Hum Genet*, 56: 784-796.

Juhász E, Nagy K. Comparison of thirteen methods for aDNA (1731-1841) extractions. In: Gyulai G (szerk.), *Plant Archaeogenetics (Botanical Research and Practices)*. Nova Science Publishers, New York, 2011:129-134.

Juhász E, Ostorházi E, Pónyai K, Silló P, Párducz L, Rozgonyi F. (2011) *Ureaplasmas*: from commensal flora to serious infections. *Rev Med Microbiol*, 22: 73-83.

Dobay O, Juhász E, Ungvári Á, Jeney C, Amyes S, Nagy K. (2009) Taguchi optimisation of a multiplex pneumococcal serotyping PCR and description of 11 novel serotyping primers. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 56: 327-338.

Talha E, Juhász E, Kanizsai S, Nagy K. (2009) Molecular detection of *T. pallidum* by PCR in seronegative cases. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 56: 181-189.

Juhász E, Ghidán A, Kemény B, Nagy K. (2008) Emergence of antiretroviral drug resistance in therapy-naïve HIV infected patients in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55: 383-394.