



KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

KLINIKA – VÝZKUM – INFORMACE
PŮVODNÍ PRÁCE – PŘEHLEDY – KAZUISTIKY

Interdisciplinární časopis
pro klinickou a laboratorní
medicínu, vydávaný pod
záštitou

Společnosti infekčního
lékařství

Společnosti pro
lékařskou mikrobiologii

a Společnosti pro
epidemiologii
a mikrobiologii

České lékařské společnosti
Jana Evangelisty Purkyně

Postavení chloramfenikolu v dnešní klinické praxi	101
Metody sekvenování druhé a třetí generace a jejich praktické využití pro typizaci bakterií	106
Respirační projevy post-covid syndromu	116

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

Interdisciplinární časopis vydávaný pod záštitou
Společnosti infekčního lékařství, Společnosti pro lékařskou mikrobiologii
a Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

REDAKČNÍ RADA

Šéfredaktor

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FN OL a LF UP v Olomouci

Zástupci šéfredaktora

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Klinika infekčních nemocí LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
Státní veterinární ústav, Olomouc

Redakční rada

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Centrum očkování a cestovní medicíny, Hradec Králové
Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Odd. klinické mikrobiologie Thomayerova nemocnice, Praha
MUDr. Pavel Dlouhý
Infekční oddělení a AIDS centrum,
Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem
Doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D.
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FN OL a LF UP v Olomouci
Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Klinika infekčních chorob, LF MU a FN Brno
Doc. RNDr. Dittmar Chmelář, Ph.D.
NRL pro anaerobní bakterie, LF Ostravské Univerzity
Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK v Praze
Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.
Čestná členka Slovenskej spoločnosti klinickej
mikrobiologie, SLS
Doc. MUDr. Lenka Krávková, CSc.
Klinika dětských infekčních nemocí, LF MU a FN Brno
MUDr. Pavla Křížová, CSc.
Státní zdravotní ústav, Praha
MUDr. Roman Kula, CSc.
Anesteziologicko-resuscitační klinika, FN Ostrava
MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, Praha
Doc. MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Infekční klinika 1. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava
MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Odd. lék. mikrobiol. a imunol. Oblast. nemocnice Trutnov
Prof. MUDr. Ivan Schrétér, CSc.
Klinika pro infekční choroby, LF UPJŠ, Košice
Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Infekční klinika 1. LF, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Ústav farmakologie, FN a LF UP v Olomouci
MUDr. Eva Zampachová
Centrální laboratoře, laboratoř virologie, Nemocnice
České Budějovice, a. s.

OBSAH

ÚVODNÍK

S. Plíšek

99

PŮVODNÍ PRÁCE

Postavení chloramfenikolu v dnešní klinické praxi

O. Džupová, J. Beneš

101

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Metody sekvenování druhé a třetí generace a jejich praktické využití pro typizaci bakterií

*M. Bezdíček, K. Dufková, M. Nykrýnová,
J. Hanslíková, M. Lengerová*

106

Respirační projevy post-covid syndromu

*J. Mizera, P. Jakubec, M. Sova, M. Vykopal,
P. Pobeha, S. Genzor*

116



VYDAVATEL

a adresa redakce:

TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov
Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563
redakce@trios.cz, http://kml.trios.cz
Redakce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Inzerce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Sazba: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4
Tisk: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.
Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

Časopis je indexován a excerptován v databázích Medline/Index Medicus,
Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

Vychází 4x ročně, roční předplatné 575,- Kč.

Povoleno Ministerstvem kultury ČR pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-264X

Podávání novinových zásilek povolila Česká pošta, s. p., odštěpný závod Praha, čj. nov. 5449/95 ze dne 7. 12. 1995. Vydavatel nese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků nebo inzerce. Současně si vyhrazuje právo na drobné stylistické úpravy článků. Žádná část tohoto časopisu nesmí být bez předchozího písemného souhlasu vlastníka autorských práv kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoliv formě či jakýmkoliv způsobem (ať mechanickým, nebo elektronickým – včetně pořizování fotokopii, nahrávek či informačních databází).



CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Interdisciplinary journal published under the auspices
of the Societies for Clinical Microbiology, for Epidemiology and Microbiology and for Infectious Diseases,
Members of the Czech Medical Association of Jan Evangelista Purkyně

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Editors

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Department of Infectious Diseases, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
State Veterinary Institute, Olomouc

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Dept. Infect. Dis. 3rd Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Vaccination Centre and Travel Medicine, Hradec Králové

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Thomayer Univ. Hospital,
Prague

MUDr. Pavel Dlouhý
Department of Infectious Diseases and AIDS Centre,
Masaryk Hospital in Ústí nad Labem

Doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D.
Dept. Infect. Dis. 3rd Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine,
Masaryk University and University Hospital in Brno

Doc. RNDr. Dittmar Chmelář, Ph.D.
Dpt. of Biomedical Sciences, University
of Ostrava's Faculty of Medicine

Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Inst. of Immunol. and Microbiol., 1st Fac. of Med., Charles
Univ. in Prague and General Univ. Hosp. in Prague

Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.
Honorary member of Slovak Society of Clinical Microbiology

Doc. MUDr. Lenka Krbková, CSc.
Clinic of Children's Infectious Diseases,
Masaryk University and University Hospital in Brno

MUDr. Pavla Křížová, CSc.
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Roman Kula, CSc.
Dept. of Anaesthesiology and Resuscit., Univ. Hosp. Ostrava

MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Inst. Med. Microbiol. Charles Univ. 2nd Med. Fac. Prague

Doc. MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Dept. of Infect. Dis. 1st Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Dept. Infectious Diseases, University Hospital Ostrava

MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Dept. Med. Microbiol. Immunol. Regional Hospital Trutnov

Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.
Clinic of Infectious Diseases, Medical faculty, Košice

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Dept. Infect. Dis. 1st Med. Faculty, Charles Univ., Prague

Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Dept. of Pharmacology, Univ. Hospital Olomouc and Faculty
of Medicine and Dentistry, Palacký Univ. Olomouc

MUDr. Eva Žampachová
Central Laboratories, The Laboratory of Virology,
Hospital České Budějovice

CONTENTS

EDITORIAL

S. Plíšek

99

ORIGINAL ARTICLE

Role of chloramphenicol in current clinical practice

O. Džupová, J. Beneš

101

REVIEW

Application of second- and third-generation sequencing for bacterial typing

*M. Bezdíček, K. Dufková, M. Nykrýnová,
J. Hanslíková, M. Lengerová*

106

Respiratory manifestations of post-COVID syndrome

*J. Mížera, P. Jakubec, M. Sova, M. Vykopal,
P. Pobeha, S. Genzor*

116



spol. s r. o.

PUBLISHER

and Editorial Office:

Redakce TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563
redakce@trios.cz, <http://kml.trios.cz>

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

DTP: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4

Printed by: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.

Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

This journal is Indexed in Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica
Database and Scopus.

A peer – reviewed journal

4 issues per volume.

ISSN 1211-264X

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

The views expressed in this journal are not necessarily those of the Editor or Editorial Board.

Úvodník

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

čtvrté číslo našeho časopisu se vám dostává do rukou s určitým zpožděním. Doufám ale, že i nadále nám zachováte přízeň a my vám budeme v KMILu představovat články, ve kterých najdete poučení a inspiraci.

V první, původní práci se pražští autoři zabývají postavením chloramfenikolu v současné klinické praxi. V létě minulého roku provedli dotazníkový průzkum, který se týkal používání chloramfenikolu v antiinfekční léčbě. O vyplnění dotazníku požádali primáře všech lůžkových infekčních oddělení, nemocniční infektology a konzultující mikrobiology z ATB středisek ve velkých fakultních nemocnicích bez infekčního oddělení. Výsledkem dotazníkové akce bylo zjištění, že se toto ATB používá v méně než polovině dotázaných nemocnic. Autoři se přimlouvají za určitou renesanci chloramfenikolu ve správných indikacích.

V druhém, přehledovém článku brněňští kolegové představují metody sekvenování druhé a třetí generace i jejich

praktické využití pro typizaci bakterií. V článku autoři popisují v současné době používané sekvenační platformy včetně zpracování sekvenačních dat. Dále se zabývají možným využitím výsledků sekvenování nové generace v mikrobiologii. Autoři jsou přesvědčeni, že celogenomové sekvenování do budoucna nahradí klasické typizační techniky.

Poslední text v pořadí, přehledový článek pneumologů z Olomouce, Brna a Košic se zabývá aktuálními znalostmi o plicním postižení v rámci postcovidového syndromu. Nejčastěji je popisován vznik plicní fibrózy, zejména po prodělaném kritickém průběhu onemocnění covid-19. V článku jsou podrobně popsány vyšetřovací a terapeutické možnosti.

Přeji vám, aby se vám články v tomto čísle líbily.

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.

Postavení chloramfenikolu v dnešní klinické praxi

O. DŽUPOVÁ, J. BENEŠ

Klinika infekčních nemocí, 3. LF UK a Fakultní nemocnice Bulovka

SOUHRN

Džupová O., Beneš J.: **Postavení chloramfenikolu v dnešní klinické praxi**

Úvod: Chloramfenikol je antibiotikum se širokým spektrem účinku a výborným průnikem do tkání. V klinické praxi se hojně používal do 70. let minulého století, avšak kvůli své potenciální myelotoxicitě byl v dalších letech postupně nahrazen nově zavedenými antibiotiky. Cílem studie bylo zjistit, do jaké míry je v současnosti používán v České republice a s jakými zkušenostmi.

Metody: V červenci a srpnu 2022 byl proveden dotazníkový průzkum. O vyplnění dotazníku byli požádáni primáři všech lůžkových infekčních oddělení, nemocniční infektologové a dále konzultující mikrobiologové z antibiotických středisek ve velkých fakultních nemocnicích bez infekčního oddělení.

Výsledky: Studie se zúčastnilo 35 z 39 oslovených pracovišť, návratnost dotazníků byla 90 %. Chloramfenikol se používá v 37 % zúčastněných nemocnic s frekvencí do 10 léčených pacientů za rok. Nejčastějšími indikacemi jsou mozkový absces, purulentní meningitida, nitrobrášň, pánevní a plicní abscesy a smíšené infekce s podílem anaerobů. Chloramfenikol je téměř vždy podán jako alternativní antibiotikum z důvodu polyvalentní alergie, bakteriální rezistence a selhání předchozí léčby. Šedesát šest procent respondentů popsal účinek jako spolehlivý nebo částečně spolehlivý, 34 % účinek nehodnotilo. Za maximální dávku pro dospělého pacienta považovalo 52 % dotázaných dávku 8–9 g. S myelotoxickými účinky chloramfenikolu se 60 % respondentů v praxi nesetkalo nebo nemohlo hodnotit, 37 % pozorovalo aspoň jednou reverzibilní útlum dřeně a pouze jediný respondent se jednou setkal s aplastickou anémií.

Závěr: V České republice se chloramfenikol v současné době používá v méně než polovině nemocnic, což je škoda. Pro svoje unikátní vlastnosti má místo i v dnešní antiinfekční léčbě. Ve správné indikaci a po zvážení benefitu a rizika může být vhodnou a někdy i život zachraňující alternativou.

Klíčová slova: chloramfenikol, antibiotická politika, aplastická anémie

SUMMARY

Džupová O., Beneš J.: **Role of chloramphenicol in current clinical practice**

Introduction: Chloramphenicol is an antibiotic with a broad spectrum of action and excellent tissue penetration. It had been widely used in clinical practice until the 1970s, but due to its potential myelotoxicity, it was gradually replaced by newly introduced antibiotics in the following years. The aim of the study was to find out to what extent and with what experience it is currently used in the Czech Republic.

Methods: A questionnaire survey was conducted in July and August 2022. The heads of all inpatient infectious diseases departments, hospital infectious diseases specialists and consulting microbiologists from antibiotic centers in large teaching hospitals without an infectious diseases department were asked to fill out the questionnaire.

Results: Thirty-five out of 39 hospitals contacted took part in the study, a response rate of 90 %. Chloramphenicol is used in 37 % of participating hospitals, with a frequency of up to 10 patients treated per year. The most common indications are brain abscesses, purulent meningitis, intra-abdominal, pelvic and lung abscesses, and polymicrobial infections with anaerobes. Chloramphenicol is almost always administered as an alternative antibiotic because of polyvalent allergy, bacterial resistance, and failure of previous treatment. Sixty-six percent of respondents described the effect as reliable or partially reliable, 34 % did not rate the effect. Fifty-two percent of respondents considered a dose of 8–9 g to be the maximum dose for an adult patient. In practice, 60 % of respondents did not encounter or could not assess the myelotoxic effects of chloramphenicol, 37 % observed reversible bone marrow suppression at least once, and only one respondent encountered aplastic anemia once.

Conclusion: Unfortunately, chloramphenicol is currently used in less than half of hospitals in the Czech Republic. Because of its unique properties, it still has a place in today's anti-infective treatment. When properly indicated and after weighing the benefits and risks, it can be a suitable and sometimes life-saving alternative.

Keywords: chloramphenicol, antibiotic policy, anemia, aplastic

Klin mikrobiol inf lék 2022;28(4):101–105

Adresa: doc. MUDr. Olga Džupová, Ph.D., 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Klinika infekčních nemocí, Nemocnice Na Bulovce, Budínova 2, 180 00 Praha 8, e-mail: olga.dzupova@lf3.cuni.cz

Došlo do redakce: 29. 11. 2022

Schváleno k tisku: 2. 2. 2023

Úvod

Chloramfenikol patří mezi nejdéle známá antibiotika. Byl objeven v roce 1947 jako produkt půdní bakterie *Streptomyces venezuelae* a od roku 1949 se začal používat léčebně [1]. V bakteriální buňce inhibuje proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku ribozomu. Má bakteriostatický účinek na většinu citlivých bakterií. U některých bakterií, např. meningitických patogenů (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningi-*

tidis, *Streptococcus pneumoniae*), byl popsán při vysoké dávce baktericidní účinek. Spektrum bakterií citlivých na chloramfenikol je velmi široké, zahrnuje aerobní a anaerobní grampozitivní a gramnegativní bakterie, atypické bakterie a spirochety. Nepůsobí na nefermentující gramnegativní tyčinky (pseudomonády, acinetobaktery a další), mykobakterie, nokardie. Na některé bakterie má variabilní účinek, např. stafylokoky, enterokoky, enterobakterie a bakteroidy.

U chloramfenikolu nebyla zjištěna přímá závislost účinku na koncentraci nebo době působení; podle analogie s jinými antibiotiky závisí jeho účinek nejspíše na parametru AUC/MIC (poměr plochy pod křivkou a minimální inhibiční koncentrace). Nejčastějším mechanismem rezistence je enzymatická inaktivace způsobená vazbou enzymu acetyltransferázy. Dalšími mechanismy jsou snížená permeabilita buněčné stěny nebo aktivní eflux antibiotika z bakteriální buňky [2].

Chloramfenikol má malou lipofilní molekulu a poměrně nízkou vazbu na bílkoviny, což umožňuje vynikající průnik do tkání a tělních tekutin, včetně těch, které jsou pro jiná antibiotika špatně dostupné, jako je mozková tkáň, likvor, výpotky, synoviální tekutina a tkáň oka. Výborně se vstřebává z gastrointestinálního traktu, jeho biologická dostupnost je po perorálním podání lepší než po intravenózním. Je metabolizován převážně (90 %) v játrech, kde je konjugován s kyselinou glukuronovou na glukuronid, který se pak vylučuje žlučí do střeva. Tam je hydrolyzován bakteriálními enzymy, opět se vstřebává a v játrech konjuguje. Neaktivní glukuronid je z oběhu eliminován ledvinami, v moči se nachází pouze 5–10 % účinného chloramfenikolu.

Chloramfenikol byl široce používán do 70. let minulého století. Po zavedení potencionovaných penicilinů, cefalosporinů 3. generace, fluorochinolonů a dalších moderních antibiotik byla jeho preskripce velmi omezena, především kvůli jeho potenciální myelotoxicitě. V souvislosti s narůstající rezistencí bakterií se v poslední době vracejí na světový trh různá antibiotika, jejichž výroba byla utlumena (mecilinam, kolistin, fosfomycin, kyselina fusidová), a tento vývoj se týká i chloramfenikolu. Chloramfenikol je v ČR stále dostupný, zajímalo nás proto, do jaké míry je reálně využíván a jaké jsou s jeho používáním zkušenosti.

Design dotazníkového průzkumu

V červenci a srpnu 2022 jsme zorganizovali studii, v níž jsme oslovili primáře všech lůžkových infekčních oddělení a klinik, samostatně pracující nemocniční infektology a také konzultující lékaře-mikrobiology z antibiotických středisek, která působí ve velkých fakultních nemocnicích bez infekčního oddělení. Všichni oslovení byli požádáni, aby vyplnili jednostránkový dotazník s osmi otázkami (obr. 1).

Výsledky

Podle uvedených kritérií byli osloveni lékaři v 39 nemocnicích v ČR. Získali jsme 35 odpovědí (90 %), z toho 24 z lůžkových infekčních oddělení a klinik, sedm od ambulancí a konziliárních infektologů a čtyři od mikrobiologů. Někteří respondenti odpověděli jen na část otázek.

Chloramfenikol se používá ve 13 nemocnicích, které se zúčastnily průzkumu (37 %), nejčastěji na infekčních oddě-

Obrázek 1

Dotazník o používání chloramfenikolu

Dotazník o používání chloramfenikolu

- 1) Podáváte na vašem pracovišti chloramfenikol?
 - ne (naposledy jsme jej podávali asi před lety)
 - ano, výjimečně, maximálně 1× ročně
 - ano, zřídka, asi 1–5× ročně
 - ano, asi 6–10× ročně
 - ano, víc než 10× ročně
- 2) Podává se ve vaší nemocnici chloramfenikol na jiném pracovišti, než je infekční oddělení?
 - ne
 - nevím
 - ano
- 3) U jakého typu infekcí jej indikujete? Prosim zkuste charakterizovat typickou situaci, kdy podáváte (byste podali) chloramfenikol. (Úmyslně vám nedáváme možnosti na výběr, abychom neovlivňovali vaše vyjadřování.)
- 4) Důvod pro podání chloramfenikolu na vašem pracovišti (můžete zvolit víc možností):
 - považujete ho za lék 1. volby, nejvhodnější pro léčbu konkrétní infekce:
 - nemůžete podat jiné antibiotikum, např. kvůli alergii
 - podáte ho méně perspektivním pacientům, abyste šetřili záložní antibiotika a nezvyšovali selekční tlak na zvyšování rezistence vůči nim
 - léčba chloramfenikolem je ekonomicky výhodnější
 - jiný důvod:
- 5) Jak celkově hodnotíte efekt léčby chloramfenikolem u svých pacientů?
 - dobré zkušenosti, obvykle nezklamal
 - u některých pacientů byl účinný, u jiných selhal
 - spíše špatné zkušenosti, většinou nevedl k potlačení infekce
 - jiné hodnocení:
- 6) Jakou denní dávku chloramfenikolu považujete za maximální u pacienta se standardní farmakokinetikou (čili s hmotností 80 kg a normální funkcí jater a ledvin)?
 - 6 g/den
 - 8–9 g/den
 - víc než 9 g/den
- 7) Setkali jste se během své praxe s útlumem kostní dřeně v důsledku léčby chloramfenikolem?
 - ne
 - ano, šlo o přechodný, reverzibilní útlum
 - ano, šlo o ireverzibilní útlum, který si vyžádal speciální hematologickou léčbu (např. transplantaci kostní dřeně)
 - nevzpomínám si, nedokážu posoudit
- 8) Pozorovali jste po/při léčbě chloramfenikolem nějaký jiný nežádoucí účinek?

leních, ale také v intenzivní péči, chirurgii a neurochirurgii. Jedná se o vzácně podávané antibiotikum; frekvence této léčby v jednotlivých nemocnicích zpravidla nepřevyšuje 10 pacientů ročně.

Nejčastější indikace pro podání chloramfenikolu podle mínění respondentů jsou obsaženy v *tabulce 1*. Většina respondentů by použila chloramfenikol jako alternativní volbu. Pouze čtyři respondenti jej považovali za lék první volby, a to tři u břišního tyfu, jeden u mozkového abscesu.

Ve výčtu okolností, které vedou k rozhodnutí podat pacientovi chloramfenikol, uvedlo 21 respondentů (60 %) polyvalentní alergii na jiná antibiotika, šest respondentů (17 %) snahu nezvyšovat selekční tlak a rozvoj rezistence na záložní antibiotika. Dalšími důvody bylo selhání předchozí antibiotické léčby, rezistence bakterií a výborný průnik do tkání.

Jako spolehlivě účinný hodnotilo chloramfenikol 15 respondentů, jako částečně účinný čtyři a jako neúčinný žádný respondent, avšak deset respondentů se nemohlo vyjádřit vzhledem k nedostatku vlastních zkušeností.

Za maximální denní množství chloramfenikolu pro dospělého pacienta o váze 80 kg se standardní farmakokinetikou považovalo 52 % dotázaných dávku 8–9 g. Dalších osm respondentů (30 %) uvedlo dávku 6 g.

Přehled a výskyt zaznamenaných nežádoucích účinků chloramfenikolu je uveden v *tabulce 2*. Pouze jednou byla diagnostikována aplastická anemie po chloramfenikolu ve formě vaginálních globulí a pacientka byla vyléčena transplantací kostní dřeně.

Diskuze a komentář

a) Indikace chloramfenikolu

Chloramfenikol ve většině rozvinutých zemí téměř vymizel z klinického použití, protože je spojován s rizikem rozvoje aplastické anemie. V současnosti se ve větší míře používá v ekonomicky chudých zemích, kde je dostupný v tabletové formě, levný a volně prodejný. V podmínkách ČR může být chloramfenikol využíván v několika indikacích, které vycházejí z jeho schopnosti mimořádně snadno pronikat přes různé biologické bariéry:

- **Absces mozku:** Při léčbě mozkového abscesu musí antibiotikum překonat dvě překážky – hematolymphatickou nebo hemoencefalickou bariéru, a poté druhou bariéru tvořenou stěnou abscesu.
- **Závažné intracelulární infekce** (břišní tyfus, paratyfus A, skvrnitý tyf a další rickettsiázy, mor a podobně): I v těchto případech musí antibiotikum překonat dvě překážky, protože patogenní agens se zpravidla nevyskytuje volně v cytoplazmě, nýbrž ve fagozomu nebo podobné buněčné organele. Preferovaným způsobem léčby jsou u těchto infekcí fluorochinolony, u nich však také existuje riziko idiosynkratických závažných nežádoucích účinků, a není zde tak velká terapeutická šíře jako u chloramfenikolu.
- **Subakutní infekce probíhající ve špatně prokrvených tkáních** (dekubity, aspirační pneumonie, chronické infiltráty a granulomy, které nemohou být řešeny chirurgicky, a podobně): V důsledku špatného prokrvení jsou tyto tkáně špatně dostupné pro běžná antibiotika, která se distribuují

Tabulka 1

Infekční choroby, u kterých by respondenti indikovali podání chloramfenikolu

mozkový absces, purulentní meningitida, shuntová meningitida
nitrobřišní, pánevní, plicní abscesy
smíšené infekce s podílem anaerobních bakterií
břišní tyfus a paratyfy
infekce měkkých tkání
infekce vyvolané multirezistentními bakteriemi
pertusse
salmonelová sepe
aspirační pneumonie
spondylodiscitida
konjunktivitida – lokálně ve formě očních kapek

Tabulka 2

Zkušenosti s nežádoucími účinky léčby chloramfenikolem

Útlum kostní dřeně po chloramfenikolu	Počet odpovědí
nesetkal(a) jsem se/nevím/nemohu hodnotit	18
reverzibilní útlum dřeně	11
aplastická anemie	1 ^a
Jiný nežádoucí účinek chloramfenikolu	
nesetkal(a) jsem se/nevím/nemohu hodnotit	28
elevace jaterních enzymů	1
exantém	1

^a po lokální aplikaci

krví a do ložiska infekce se dostávají díky zvýšené permeabilitě cév při zánětu a exsudaci. Zároveň platí, že tyto infekce jsou často multibakteriální, s významnou účastí mikroaerofilních mikrobů (viridující streptokoky) nebo i striktně anaerobních bakterií, a proti těmto bakteriím je chloramfenikol velice dobře účinný. V běžné praxi se tento typ infekcí často léčí kombinací dvou antibiotik (např. beta-laktam a metronidazol) nebo tigeicyklinem; chloramfenikol představuje dobrou alternativu.

- **Pertusse:** Při léčbě těžké formy černého kašle bude průnik chloramfenikolu do bronchiálního sekretu stejně dobrý jako průnik makrolidů, které se k léčbě používají nejčastěji. Při léčbě chloramfenikolem však můžeme použít vyšší dávkování, a tím dosáhnout lepší účinnosti.
- **Bioteroristický útok:** Chloramfenikol je účinný proti třem patogenním bakteriím, které by mohly být zneužity jako

biologická zbraň – *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* a *Francisella tularensis*. K profylaxi po expozici těmto biozbraním se sice všeobecně doporučují fluorochinolony [3], nelze však vyloučit, že by teroristé použili kmeny s rezistencí k fluorochinolonom.

Naproti tomu je namístě jmenovat i situace, kdy podání chloramfenikolu podle našeho názoru není vhodné:

- **Sepse, infekční endokarditida:** Lékem volby u těchto infekcí jsou baktericidní antibiotika.
- **Lehce probíhající infekce:** U těchto infekcí je přínos léčby chloramfenikolem příliš malý vzhledem k riziku.
- **Infekce vyvolané pseudomonádami a dalšími nefermentujícími tyčinkami:** Tyto bakterie nepatří do spektra účinku chloramfenikolu. Ve studiích zahrnutých do metaanalýzy z roku 2014 byla průměrná citlivost pseudomonád 13 % a citlivost acinetobakterů maximálně 5 % [4].
- **Stafylokokové infekce:** Přestože citlivost k chloramfenikolu je u *S. aureus* včetně meticilin-rezistentních kmenů obecně dobrá v *in vitro* testech [4], klinická účinnost bývá nepřesvědčivá. Máme k dispozici řadu spolehlivěji působících antibiotik.
- **Nozokomiální infekce, infekce vyvolané multirezistentními kmeny bakterií:** Pro empirickou léčbu nozokomiálních infekcí způsobených enterobakteriemi je chloramfenikol nevhodný vzhledem k vysokému podílu rezistentních kmenů [4].

Kombinace chloramfenikolu s jinými antibiotiky, konkrétně betalaktamy a fluorochinolony, vykazovala ve studiích ze 70.–90. let nejčastěji antagonismus, pouze u kolistinu byl prokázán synergický účinek na gramnegativní bakterie [4,5]. Studie jsou však staré a netestovaly se v nich rezistentní bakterie ze skupiny ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.).

Odpovědi účastníků studie vcelku korelují s výše uvedenými indikacemi. Chloramfenikol je používán pouze v 37 % zúčastněných nemocnic a infekčních oddělení. Důvodem pro jeho použití jsou nejčastěji alergie na jiná antibiotika a nezdar předchozí antibiotické léčby. Jsou však i další legitimní důvody, proč podat nemocnému chloramfenikol, jako je snaha nezvyšovat selekční tlak záložních antibiotik typu karbapenemů, cefalosporinů vyšších generací nebo kolistinu, a nepřispívat tak k nárůstu rezistence. Rovněž podání méně perspektivnímu pacientovi je racionální rozhodnutí, které není vedeno snahou snížit cenu léčby, nýbrž omezit toxické účinky jiných antibiotik (mnohdy častější než u chloramfenikolu) a tlak na rozvoj rezistence. Významným zjištěním byl dobrý a celkem spolehlivý účinek chloramfenikolu, ani jeden respondent nepopisoval soustavné selhávání léčby.

b) Doporučené dávkování

Údaje v literatuře nejsou jednotné: Souhrn údajů o přípravku Chloramphenicol VUAB (SPC) uvádí dávku 1 gram každých 6–8 hodin, tj. 3–4 g na den, u těžkých infekcí celkovou denní dávkou až 100 mg/kg, což u dospělé osoby znamená 6–9 g. Podle rozsáhlé antibiotické monografie z roku 2010 činí maximální denní dávka 4 g [6]. Americká infek-

tologická společnost (IDSA) doporučuje pro léčbu purulentní meningitidy dávku 6 g na den [7].

Více než polovina respondentů v našem dotazníku označila jako maximální dávku pro dospělého 8–9 g na den, jen 15 % lékařů by tuto dávku překročilo. Z vlastní zkušenosti můžeme uvést, že na Klinice infekčních nemocí Fakultní nemocnice Bulovka byli chloramfenikolem léčeni pacienti s purulentní meningitidou až do konce 90. let a v této indikaci byla podávána dospělým dávka 12–16 g na den, aniž byly zaznamenány závažné vedlejší účinky.

Chloramfenikol je lipofilní antibiotikum, s distribucí nejen do vodního prostředí, ale i do tukové tkáně. Proto považujeme za správné řídit dávkování podle celkové tělesné hmotnosti. Dávku 100 mg/kg/den u závažných infekcí doporučenou v SPC injekčního chloramfenikolu tedy považujeme za adekvátní.

U pacientů s renální insuficiencí není třeba dávku redukovat. Dialýzou se eliminuje jen minimálně, proto se nepodává dodatečná dávka po dialýze. O dávkování při kontinuální eliminaci není dostatek dat. Při těžším stupni jaterního poškození by neměl být použit.

c) Nežádoucí účinky

Nejčastější nežádoucí účinky chloramfenikolu jsou nespecifické – nauzea, zvracení, alergické reakce a projevy dysmikrobie, jako jsou průjemy a slizniční kandidóza.

Dalším vedlejším účinkem chloramfenikolu je poškození nervové tkáně, jehož příčinou je pravděpodobně účinek na mitochondrie. Může se projevit zmateností, poruchou chování, depresí nebo periferní neuropatií, zvláště obávaná je neuropatie optického nervu. U novorozenců může chloramfenikol způsobit tzv. gray baby syndrom, což je obraz intoxikace v důsledku nedostatečné jaterní glukuronidace a renální eliminace chloramfenikolu. Projevuje se zvracením, vzedmutím břicha, cyanózou až oběhovým selháním. Mezi možnými nežádoucími účinky je nutné zmínit i lékové interakce, které vznikají v souvislosti s metabolizací chloramfenikolu na jaterních cytochomech [2].

Nejobávanějším nežádoucím účinkem je útlum kostní dřeviny. Tato myelotoxicita má dvě formy, které se navzájem liší patogenezi i závažností. Reverzibilní dřevňový útlum, jehož příčinou je inhibice proteosyntézy v mitochondriích, se objevuje častěji. Je závislý na kumulativní dávce, obvykle vzniká v průběhu léčby a projevuje se poklesem počtu trombocytů, retikulocytů a leukocytů. Po ukončení léčby se změny spontánně upraví.

Aplastická anemie po chloramfenikolu je velmi vzácná, její riziko se odhaduje na jednoho postiženého z 24 500 až 40 800 léčených [8]. Popisuje se jako idiosynkratická reakce, nezávislá na dávce, která se projevuje za týdny až měsíce po léčbě, někdy i během léčby. Patogeneze není úplně objasněna. Pravděpodobně jde o souhru vnitřních příčin, jako je genetická predispozice, např. přítomnost HLA-DR2, a příčin vnějších, jako je záření, chemické látky, viry anebo chloramfenikol. Chloramfenikol je tedy jen jedním z možných vyvolatelů aplastické anemie, a protože tato komplikace obvykle nevzniká bezprostředně po léčbě, je obtížné spolehlivě určit příčinnou souvislost. Jedna z hypotéz předpokládá působení toxických dusíkatých derivátů chloramfeni-

kolu, které vznikají při jeho biodegradaci bakteriálními enzymy v zažívacím traktu a přímo poškozují DNA kmenových hematopoetických buněk [9]. Mohlo by také jít o imunopatologický děj, svědčí pro to jednak časový odstup od podávané léčby, dále pozorování, že riziko této komplikace se zvyšuje při opakovaném podávání, a konečně i skutečnost, že rozvoj anemie byl popsán i po lokální aplikaci chloramfenikolu ve formě očních kapek, s velmi nízkým rizikem 1 : 1 000 000 léčených [10].

Aplastická anemie je hlavním důvodem, proč byl chloramfenikol odsunut hluboko do záložní léčby. Její riziko je přitom významně nižší než například riziko poškození kolagenových struktur při léčbě fluorochinolony, o jejichž podání se rozhodujeme daleko snadněji (jen riziko vzniku aneurysmatu a disekce aorty bylo u exponovaných jedinců bez ohledu na věk vyčísleno na 1 : 7 200; u seniorů bylo riziko 10× vyšší, tj. 1 : 700) [11,12]. Dokonce penicilin, který vnímáme jako bezpečné antibiotikum, je spojen s rizikem smrtelné anafylaxe 1 : 100 000 [13,14]. Je také namístě dodat, že aplastická anemie v současnosti už nemusí představovat smrtelnou komplikaci; lze ji vyléčit transplantací kostní dřeně, což je nepochybně náročný a drahý postup, avšak představuje řešení dříve bezvýchodné situace.

Domníváme se, že pro snížení rizika léčby chloramfenikolem by bylo vhodné uplatňovat následující opatření:

- Podávat chloramfenikol jen v situacích, kdy se plně uplatní jeho výjimečné vlastnosti.
- Nepodávat chloramfenikol opakovaně. S tím souvisí doporučení evidovat každé (i lokální) podávání chloramfenikolu v dokumentaci pacienta.
- Při léčbě celkově podávaným chloramfenikolem kontrolovat krevní obraz, včetně retikulocytů dvakrát týdně (včasné zachycení reverzibilního útlumu kostní dřeně).
- Upozornit pacienta, že v případě vzniku nových potíží za několik měsíců po léčbě je nutné podstoupit lékařské vyšetření spojené s odběrem krve na stanovení krevního obrazu.

Závěr

Chloramfenikol byl pro svoji obávanou myelotoxicitu v mnoha rozvinutých zemích nahrazen jinými antibiotiky. V České republice se v současné době používá v méně než polovině dotázaných nemocnic. Pro svoje unikátní vlastnosti nepochybně má místo i v dnešní antiinfekční léčbě a měl by se vrátit do klinických rozvah o volbě antibiotika u určitých pacientů a diagnóz. Pokud je správně indikován a zvážen jeho benefit a rizika, může být vhodnou a někdy i život zachraňující alternativou.

Poděkování

Autoři děkují všem účastníkům průzkumu, kteří přispěli k jeho realizaci vrácením vyplněného dotazníku. V abecedním pořadí: Tamara Bergerová (Plzeň), Josef Blažek (Kyjov),

Pavel Dlouhý (Ústí nad Labem), Daniel Fuchs (Břeclav), Helena Fukalová (Vsetín), Tomáš Habanec (Brno), Petr Husa (Brno), Aleš Chrdle (České Budějovice), Marie Kotišová (Strakonice), Eva Krejčí (Ostrava), Jiří Kubát (Havlíčkův Brod), Romana Kumštarová (Jihlava), Petr Kumpel (Opava), Ivo Mífek (Havířov), Pavel Němec (Pardubice), Kateřina Pestrová (Hranice), Lenka Petroušová (Ostrava), Sylvie Polívková (Kolín), Zbyšek Pospíšil (Třebíč), Jaroslava Poustková (Karlovy Vary), Petr Prášil (Hradec Králové), Zdeněk Prokeš (Prostějov), Petr Smejkal (Praha), Jana Sysová (Tábor), Yvona Šrámková (Znojmo), Marek Štefan (Praha), Miloslav Šťastník (Nové Město na Moravě), Barbora Šumíčková (Uherské Hradiště), Renata Tejkalová (Brno), Martin Tulach (Praha), Iva Vágnerová (Olomouc), Adam Vitouš (Liberec), Jitka Zítová (Mělník), Milan Zlámal (Praha).

Literatura

1. Beneš J. Amfenikoly. In: Beneš J. Antibiotika. Systematika, vlastnosti, použití. 1. vyd. Praha: Grada publishing 2018; s. 459–468.
2. Moffa M, Brook I. Tetracyclines, glycylyclines, and chloramphenicol. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2015; pp 322–338.
3. Borio LL, Henderson DA, Hynes NA. Bioterrorism: an overview. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds.). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2015; pp 178–190.
4. Civljak R, Gianella M, Di Bella S, Petrosillo N. Could chloramphenicol be used against ESKAPE pathogens: A review of in vitro data in the literature from the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12(2):249–264.
5. Kawakami M, Nagai Z, Shimizu S, Mitsuhashi S. Anti-microbial effect of combinations of colistin methanesulfonate and chloramphenicol. I. In vitro effect. *J Antibiot (Tokyo).* 1971;24(12):884–891.
6. MacLaren G, Shann E. Chloramphenicol and thiamphenicol. In: Grayson ML (ed.). Kucer's The use of antibiotics, 6th ed. London: Hodder Arnold/ASM Press 2010; pp 1008–1029.
7. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 2004;39: 1267–1284.
8. Feder Jr HM, Osier C, Maderazo EG. Chloramphenicol: A review of its clinical use in clinical practice. *Rev Infect Dis.* 1981;3(3):479–491. doi: 10.1093/clinids/3.3.479
9. Jimenez JJ, Arimura GK, Abou-Khalil WH, Isildar M, Yunis AA. Chloramphenicol-induced bone marrow injury: Possible role of bacterial metabolites of chloramphenicol. *Blood.* 1987;70(4):1180–1185.
10. Laporte JR, Vidal X, Ballarín E, Ibáñez L. Possible association between ocular chloramphenicol and aplastic anaemia – the absolute risk is very low. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;46:181–184.
11. Noman AT, Qazi AH, Alqasrawi M, et al. Fluoroquinolones and the risk of aortopathy: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2019;74(1):299–302. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.09.067
12. Wee I, Chin B, Syn N, et al. The association between fluoroquinolones and aortic dissection and aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2021;11:11073. doi.org/10.1038/s41598-021-90692-8
13. Kaufman DW. Risk of anaphylaxis in a hospital population in relation to the use of various drugs: an international study; International collaborative study of severe anaphylaxis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2003; 12:195–202. doi.org/10.1002/pds.822
14. Rudolph AH, Price EV. Penicillin reactions among patients in general disease clinics: A national survey. *JAMA.* 1973;223:499–501.

Metody sekvenování druhé a třetí generace a jejich praktické využití pro typizaci bakterií

M. BEZDÍČEK^{1,2}, K. DUFKOVÁ^{1,2}, M. NYKRÝNOVÁ^{1,3}, J. HANSLIKOVÁ¹, M. LENGEROVÁ^{1,2}

¹Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno;

²Interní hematologická a onkologická klinika, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno;

³Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické, Brno

SOUHRN

Bezdiček M., Dufková K., Nykrýnová M., Hansliková J., Lengerová M.: **Metody sekvenování druhé a třetí generace a jejich praktické využití pro typizaci bakterií**

Metody sekvenování nové generace nám umožňují zcela zásadním způsobem prohloubit znalosti o studovaných mikroorganismech a data získaná celogenomovým sekvenováním lze využít pro řadu různých analýz. Autoři článku poskytují přehled a příklady použití celogenomové sekvenace pro molekulární typizaci bakterií. Článek je zaměřen na popis principu jednotlivých sekvenačních metod, vyhodnocení získaných výsledků a jejich použití v praxi.

Klíčová slova: celogenomové sekvenování, molekulární typizace, nemocniční epidemiologie

SUMMARY

Bezdiček M., Dufková K., Nykrýnová M., Hansliková J., Lengerová M.: **Application of second- and third-generation sequencing for bacterial typing**

Whole-genome sequencing (WGS) is a modern method that allows deep understanding of studied organisms and is currently gaining importance in molecular microbiology. Data obtained by whole-genome sequencing can be used for a number of different analyses, specifically in bacterial epidemiology. The authors provide an overview of the methods that are used for bacterial typing, description of their principles with subsequent possibilities for evaluation of the obtained data and applications in hospital research.

Keywords: whole-genome sequencing, molecular typing, hospital epidemiology

Klin mikrobiol inf lék 2022;28(4):106–115

Adresa: doc. Mgr. Martina Lengerová, Ph.D., Interní hematologická a onkologická klinika, Černopolská 9, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: Lengerova.Martina@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 25. 1. 2023

Schváleno k tisku: 22. 3. 2023

Úvod

Molekulárně-biologické metody se staly nedílnou součástí moderní lékařské mikrobiologie. Specifickou oblastí je jejich využití pro typizaci bakteriálních kmenů, která je klíčová v lokální epidemiologii nozokomiálních infekcí. Data získaná pomocí typizačních metod lze využít k rychlé detekci lokálních outbreaků, kontrole jejich průběhu a cílenému a včasnému zavedení kontrolních protiepidemických opatření. Důležitou roli hraje typizace také v získávání poznatků o šíření bakteriální rezistence, nebo hledání souvislostí mezi nesenou genetickou informací a patogenitou mikrobů. Dále je důležitým nástrojem pro studium dynamiky

bakteriálních populací a sledování šíření epidemiologicky úspěšných kmenů.

Mezi tradiční metody typizace patří zejména pulzní gelová elektroforéza (PFGE; z angl. pulse-field gel electrophoresis) [1] a multilokusová sekvenační typizace (MLST; z angl. multilocus sequence typing) [2]. PFGE je založena na štěpení genomové DNA restrikčními enzymy, separaci DNA fragmentů v elektrickém poli periodicky měnícím směr a přímém porovnávání získaných profilů. Mezi hlavní nevýhody této metody patří časová a laboratorní náročnost, relativně malá propustnost, vysoká citlivost na výběr restrikčních enzymů a standardizaci protokolů pro jednotlivé

bakteriální druhy. MLST určuje genetickou příbuznost na základě sekvence 5–8 úseků housekeeping genů, nacházejících se u všech izolátů daného druhu. Jedná se o vysoce standardizovanou metodu s možností mezilaboratorního srovnání. Nevýhodou je druhová specifita, laboratorní náročnost a cena.

V současné době zažívají rychlý rozvoj metody umožňující sekvenaci a analýzu celého bakteriálního genomu. Díky nim jsme schopni sledovat rozdíly v řádu jednotek nukleotidů, a zcela tak změnit pohled na epidemiologii bakterií. Cílem tohoto přehledu je představit nejčastěji používané sekvenční platformy, základní kroky zpracování sekvenčních dat a možnosti jejich využití v typizaci bakterií a nemocniční molekulární epidemiologii.

Sekvenční platformy

V současné době jsou používány 3 různé sekvenční platformy, každá vycházející z jiné technologie sekvenování. Nejrozšířenější platformou jsou sekvenátory od společnosti Illumina, které se spolu s dalšími, méně rozšířenými platformami, řadí mezi 2. generaci sekvenování, a technologie 3. generace sekvenování, kam se řadí platformy Oxford Nanopore Technologies a Pacific Biosciences. V textu je uvedena jejich základní charakteristika. Souhrnné srovnání včetně přehledu dostupných sekvenátorů je uvedeno v tabulce 1.

Illumina

Sekvenční platformy společnosti Illumina Inc. jsou založeny na principu sekvenování syntézou [3,4]. Celý proces lze rozdělit do tří základních kroků – přípravy sekvenčních knihoven, tvorbě sekvenčních klastrů a samotné sekvenace (obrázek 1). V prvním kroku je připravena sekvenční knihovna, která se skládá z DNA fragmentů vzniklých enzymatickým nebo fyzikálním štěpením genomové DNA. Na konce vzniklých fragmentů jsou ligací připojeny dva různé adaptory (obrázek 1A). Fragmenty s napojenými adaptory jsou denaturovány a jako jednořetězcové molekuly připojeny k jednořetězcovým oligonukleotidům navázaným na povrchu reakční komůrky

Tabulka 1
Srovnání sekvenátorů platformem Illumina, Oxford Nanopore Technologies (ONT) a Pacific Biosciences

Platforma	Sekvenátor	Délka čtení [bp]	Čas [hod]	Výstup [Gb]	Cena/Mb dat [Kč]	Cena přístroje [Kč]**	Přesnost čtení [%]
Illumina	iSeq100	2 × 150	9–19	1,2	12,5	725 000	99,9
	MiniSeq	2 × 150	4–24	7,5	5	1 825 000	99,9
	MiSeq	2 × 300	4–55	15	2,5	3 650 000	99,9
	NextSeq550	2 × 150	12–30	120	0,75	9 350 000	99,9
	NextSeq 1000/2000	2 × 150	11–48	360	0,75	11 400 000	99,9
	NovaSeq 6000	2 × 250	13–44	6 000	0,25	31 900 000	99,9
Oxford Nanopore Technologies	MinION	různá*	do 72	50	4,75	25 000***	> 99 %
	GridION	různá*	do 72	250	4,75	1 250 000***	> 99 %
	PromethION 24	různá*	do 72	7 000	1	5 350 000***	> 99 %
	PromethION 48	různá*	do 72	14 000	1	7 365 000***	> 99 %
	PromethION 2	různá*	do 72	580	1	1 500 000***	> 99 %
	PromethION 2 solo	různá*	do 72	580	1	250 000***	> 99 %
Pacific Biosciences	Sequel System	> 20 000	do 30	10	4,5	8 750 000	99,9
	Sequel II System	> 20 000	do 30	10	4,5	8 750 000	99,9
	Sequel Iie System	> 20 000	do 30	10	4,5	8 750 000	99,9

* Délka čtení odpovídá délce fragmentu DNA.

** Ceny byly získány ze stránek výrobců, případně cenových nabídek. Skutečná cena se může lišit dle konkrétní cenové nabídky.

*** ONT poskytuje sekvenátory ve formě zápujčky k objednávkám sekvenčního spotřebního materiálu.

(„flow-cell“). Tyto oligonukleotidy v následujících krocích slouží jako primery, ze kterých je zahájena syntéza komplementárního vlákna k navázané templátové DNA. Vzniklé dvouřetězcové molekuly jsou opět denaturovány, původní templátové molekuly odmyty a nově syntetizovaná vlákna se svými volnými konci opět připojí k volným oligonukleotidům na povrchu reakční komůrky. Tento proces se cyklicky opakuje a nazývá se klastrová či také můstková („bridge“) PCR. Navázání molekul na blízce položené nukleotidy umožňuje vznik sekvenačních klastrů, tedy shluků sousedících identických kopií fragmentů připravených k sekvenaci (obrázek 1B). Před samotnou sekvenací jsou amplifikací vzniklé dvouřetězcové mosty naposled denaturovány a reverzní vlákna jsou chemicky odštěpena. Sekvence je prováděna z primerů hybridizovaných na adaptorové sekvence. V reakční směsi s rozdílně fluorescenčně značenými oligonukleotidy se v každém cyklu ve formě digitálního obrazu detekují signály, vznikající při uvolňování fluorescenčních značek z právě začleněných nukleotidů (obrázek 1C). Výsledná sekvenační čtení tedy vznikají spojením signálů z jednotlivých obrazů a jejich délka závisí na počtu sekvenačních cyklů. Z krátkých osekvenovaných úseků je pak možné sestavit původní delší úseky DNA (tzv. kontigy), nejčastěji pomocí mapování na známé, tzv. referenční sekven-

ce (obrázek 1D). Největší výhodou platformy Illumina je vysoká přesnost čtení, nevýhodou potom velmi krátká čtení v rozmezí 75–300 bp. V současné době jsou dostupné platformy iSeq 100, MiniSeq, MiSeq, NextSeq 550, NextSeq 1000, NextSeq 2000, HiSeq 4000 a NovaSeq 6000 (jejich porovnání je uvedeno v tabulce 1).

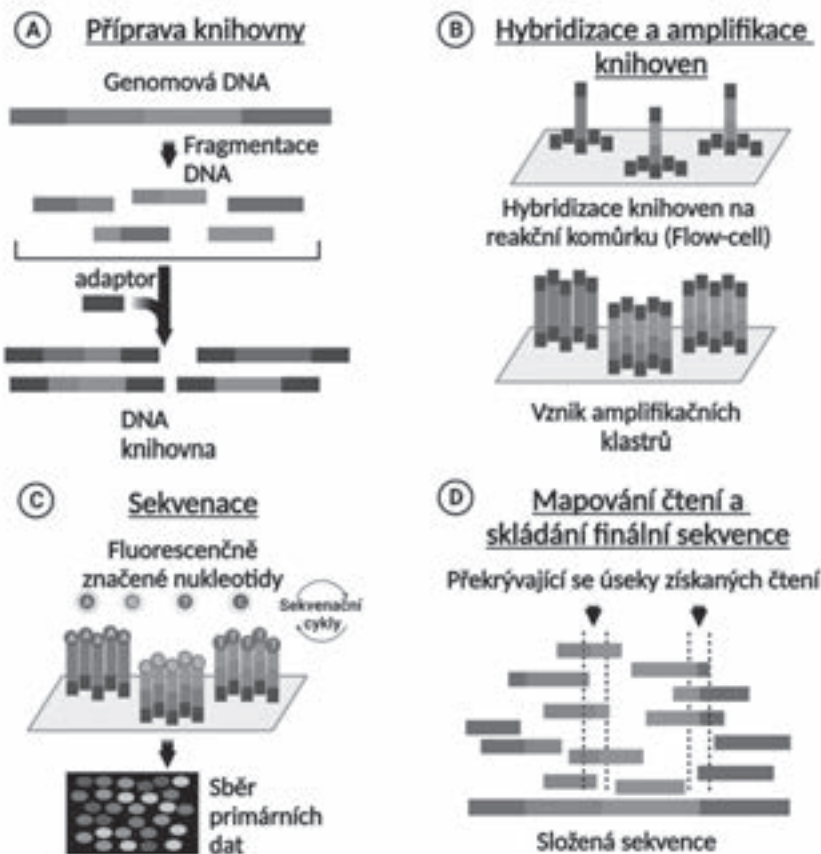
Oxford Nanopore Technologies

Sekvenování na platformě firmy Oxford Nanopore Technologies (ONT) je založeno na měření změn elektrického potenciálu při průchodu DNA nebo RNA přes nanopór (obrázek 2) [5,6]. Příprava sekvenačních knihoven je velmi jednoduchá a zahrnuje, stejně jako v předchozím případě, zejména připojení adaptorů k vláknům nukleové kyseliny. Samotné nanopóry, tvořené transmembránovým a motorovým proteinem, jsou umístěny na syntetické membráně. Při průchodu vlákna nukleové kyseliny se v závislosti na tvaru konkrétních bází specificky přerušuje iontový proud, což vede ke změně elektrického potenciálu. Nespornou výhodou této technologie je snadná, levná a rychlá příprava sekvenačních knihoven, možnost analyzovat výsledky již při probíhající sekvenaci a zejména délka jednotlivých čtení

dosahující i několik kilobází. U dřívější verze této technologie byla jako velká nevýhoda potvrzena poměrně nižší přesnost čtení (94–97 %) [7], tedy větší chybovost při přiřazování bází k získaným signálům. V současné době ONT uvádí na trh novou generaci flow cell R10.4.1, která spolu s novou sekvenační chemií verze V14 významně zvyšuje kvalitu výsledných sekvenačních dat, a eliminuje tak vyšší chybovost při zpracování hrubých sekvenačních dat do podoby finálních sekvencí. To umožňuje využít data z platformy ONT bez nutnosti jejich kombinace s krátkými čteními, které se využívají pro odstranění sekvenačních chyb. Díky tomu se celková cena sekvenace výrazně snižuje a zároveň se zjednodušují a zrychlují některé kroky při zpracování získaných sekvenačních dat. V současné době jsou dostupné platformy MinION, GridION, PromethION48 a PromethION P2, které jsou shrnuty v tabulce 1. Zajímavé jsou zejména nové verze sekvenátorů PromethION P2, které jsou určeny pro sekvenaci až dvou flow cell zároveň (oproti 24 respektive 48 flow cellám u původních verzí tohoto sekvenátoru). Přístroj je díky tomu menší, cenově dostupnější a nevyžaduje až extrémně výkonný informatičtý hardware. Díky tomu se stává vysokokapacitní sekvenování na ONT platformách dostupné i běžným laboratořím.

Obrázek 1

Princip sekvenování na platformách Illumina. Vytvořeno v BioRender.com



Pacific Biosciences

Sekvence na platformách firmy Pacific Biosciences jsou založeny na technologii sekvenování jedné molekuly DNA v reálném čase (SMRT; z angl. Single Molecule RealTime sequencing) (obrázek 3) [8]. Klíčové je při přípravě knihovny vytvořit kruhovou molekulu jednořetězcové DNA pomocí přidání vlásečkových adaptorů na oba konce DNA fragmentů (obrázek 3A). Sekvence probíhá na čipu v nanojamkách o průměru 10 nm, označovaných jako ZMW (z angl. Zero Mode Waveguides). V každé jednotlivé ZMW je na dně imobilizován komplex kruhové jednořetězcové DNA a DNA polymerázy (obrázek 3B). Vlastní sekvence se stanovuje na základě detekce fluorescenčních signálů vznikajících při inkorporaci fluorescenčně značených nukleotidů (obrázek 3C). Výhodou SMRT technologie je možnost sekvenovat oba komplementární řetězce DNA v mnoha opakováních, díky čemuž je docíleno velmi vysoké přesnosti získaných čtení. Další výhodou je možnost sekvenovat fragmenty DNA o délce i několika kilobází. Nevýhodou je potom vysoká cena v porovnání s ostatními sekvenačními platformami. V současné době jsou k dispozici sekvenátory Revio, Sequel IIe a Onso. Základní technické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1.

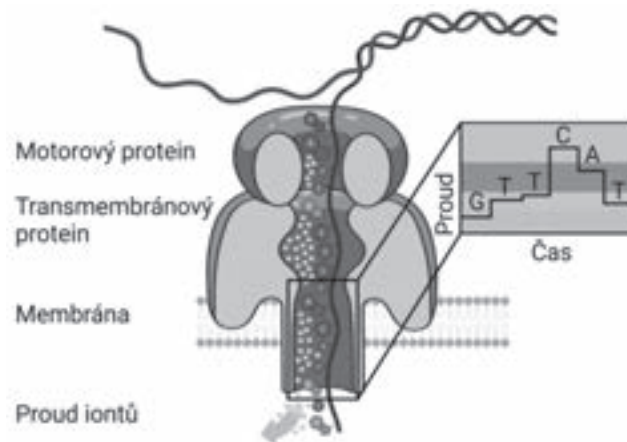
Zpracování sekvenačních dat

Zpracování sekvenačních dat probíhá na základě toho, jaká sekvenační technologie byla použita a jakou analýzu chceme následně provést. Obecně, prvním krokem je vždy kontrola kvality sekvenačních dat, následuje jejich čištění od nežádoucích sekvencí (např. adaptorů) a odstranění nekvalitních sekvencí (např. míst v genomu, která nebyla dostatečně dobře osekvenována a data tedy nejsou spolehlivá). Teprve tato data lze použít, aniž by to negativně ovlivnilo získané výsledky. Níže uvádíme postup zpracování dat pro jednotlivé sekvenační platformy, včetně příkladů vhodných softwarových nástrojů.

U dat získaných, v současnosti z nejrozšířenějších sekvenačních platform od firmy Illumina, je postup následující. Nejprve je vyhodnocena kvalita sekvenačních dat, která jsou ve FASTQ formátu. Základní sledované parametry jsou pro jednotlivá čtení jejich Phred skóre (míra kvality identifikace jednotlivých bází), podíl guanino-cytosinového komplementárního páru v DNA (GC obsah), počet duplicitních čtení, obsah adaptorů, a další, k čemuž lze využít například kombinaci softwarových nástrojů FastQC (Braham Bioinformatics) a MultiQC [9]. Pokud mají data dostatečnou kvalitu pro další zpracování, je následně provedeno odštěpení adaptorů, například pomocí nástrojů Trimmomatic [10], Cutadapt [11] nebo fastp [12]. Tyto nástroje většinou poskytují i další možnosti pro zpracování čtení, jako například odštěpení částí čtení s nízkou kvalitou. Důležitým krokem je také kontrola kontaminace, ke které lze využít například program FastQ Screen [13], který mapuje čtení oproti databázi obsahující například lidský či myší genom, sekvence kvasinek či sekvence adaptorů. V případě, že ke kontaminaci došlo, je nutné tato čtení z dalších analýz odstranit. Pro tento účel lze využít velmi rychle, i když méně přesné assembly, jako jsou BMap [14] nebo minimap2 [15], které

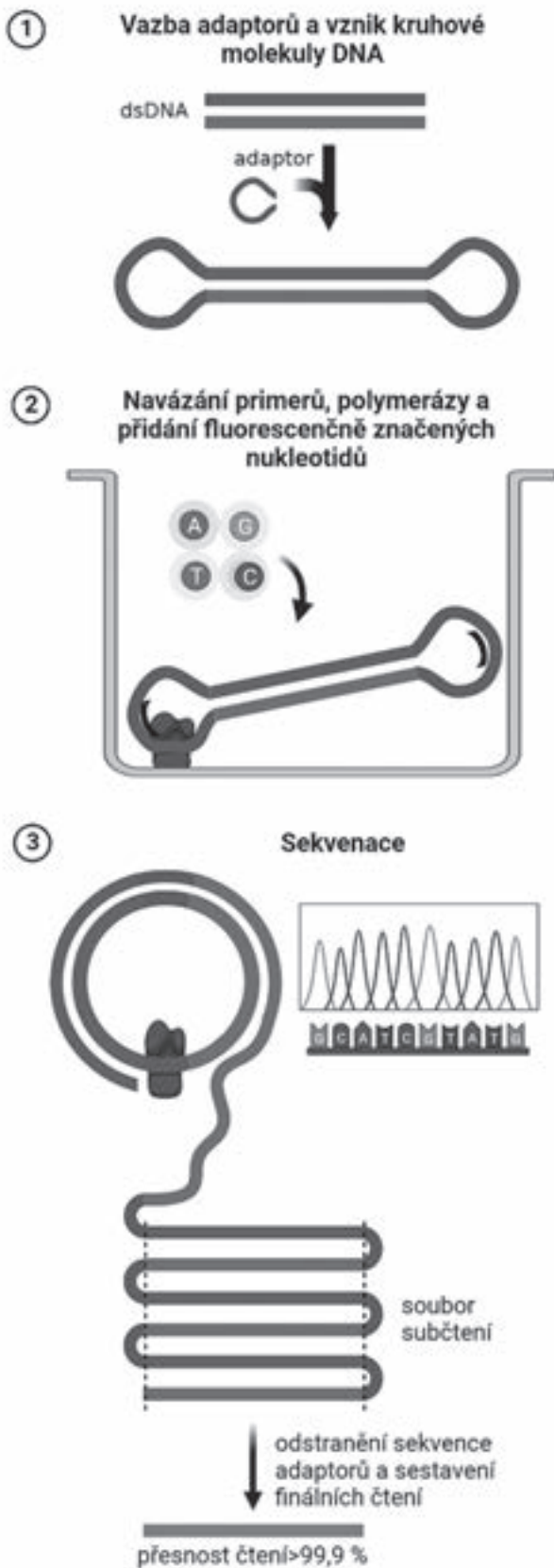
Obrázek 2

Princip sekvenování na platformách Oxford Nanopore Technologies. Vytvořeno v BioRender.com



mapují čtení ke genomům způsobujícím kontaminaci. Namapovaná čtení jsou z dalšího zpracování odstraněna a ke skládání finálních genomů jsou použita pouze nenamapovaná čtení. Čtení, která prošla kontrolou kvality, lze poté použít pro finální analýzy, a to včetně skládání genomů. Pro samotné skládání genomů existují dva možné přístupy. Prvním je skládání *de novo*, kdy ve čteních hledáme překryvy a na jejich základě sestavujeme sekvenovaný genom, aniž bychom měli informace o tom, jak by měl vypadat. *De novo* sestavování je časově a výpočetně náročné a je potřeba velké množství kvalitních čtení. Navíc se často nepodaří kompletní bakteriální genom složit a výsledkem je pouze velké množství kontigů, tedy delších úseků o velikosti od několika set kilobází do několika megabází. Na druhou stranu tento přístup umožňuje analyzovat i unikátní genomové oblasti [16]. Pro *de novo* sestavování lze použít nástroje jako SSAKE [17], Celera Assembler [18], Velvet [19] nebo SOAPdenovo2 [20]. Druhým způsobem je mapování získaných čtení k referenční sekvenci, tedy sekvenci, která je stejná, nebo velmi podobná analyzovanému genomu. K této sekvenci jsou jednotlivá čtení v průběhu skládání mapována na základě podobnosti. Tento způsob skládání je výpočetně méně náročný, a tedy i rychlejší, ale umožňuje analyzovat pouze sekvenčně příbuzné oblasti, které sdílí referenční a analyzované sekvence. Čtení z unikátních oblastí se nemají kam přiřadit a jsou odstraněna z dalších analýz. Dalším problémem při skládání genomů z krátkých čtení jsou repetitivní oblasti delší, než je délka jednotlivých čtení, a tudíž není jasné, na jaká místa se má správně dané čtení přiřadit [21]. Pro mapování k referenci lze kromě výše zmíněných assemblerů využít další nástroje, jako je BWA [22], Bowtie2 [23] či SOAP2 [24]. Po namapování jednotlivých čtení je potřeba provést další filtraci dat, kdy jsou ze zarovnání odstraněna nízkokvalitní čtení a optické či PCR duplikáty. Pro tento účel lze využít program SAMTools [25], který slouží pro

Obrázek 3
Princip sekvenování SMRT na platformách Pacific Bioscience. Vytvořeno v BioRender.com



práci se zarovnanými čteními a poskytuje i další funkce, např. extrakci čtení pouze z určité oblasti zarovnání. V posledním kroku je ze zarovnaných čtení vytvořena konsenzuální, tedy finální sekvence, což lze provést pomocí BCFtools, který je součástí již zmíněného SAMTools.

Díky odlišné technologii sekvenování u sekvenátorů ONT se zpracování získaných dat od výše uvedeného postupu liší. Data jsou ze sekvenátoru získána ve FAST5 formátu, což znamená, že jednotlivá čtení jsou zapsána ve formě proudových signálů. Nejprve jsou tyto signály převedeny do posloupnosti nukleotidů (tzv. basecalling). K tomuto účelu se nejčastěji využívá software Guppy, který je vyvíjený přímo firmou ONT. Pokud bylo v jednom sekvenačním běhu sekvenováno více vzorků, umožňuje Guppy kromě basecalling i rozřídění jednotlivých čtení daným vzorkům (tzv. demultiplexing), a zároveň poskytuje i možnost odstřížení adaptorů. Pokud jsou čtení převedena do FASTQ souborů, je možné provést kontrolu kvality. Zde lze využít nástroje, jako je pycoQC [26], nanoQC [27] či MinIONQC [28]. V dalším kroku je vhodné provést odstranění nekvalitních či krátkých čtení, pro což lze použít například software Nanofilt [27], který umožňuje i odstřížení daného počtu nukleotidů z obou stran čtení. Stejně jako v případě dat z Illuminy je žádoucí zkontrolovat, zda data nebyla kontaminována. Pro mapování čtení k referenci lze použít například minimap2, naopak pokud mají být čtení skládána *de novo*, lze pro tento účel využít softwaru, jako jsou Canu [29] nebo Flye [30]. Dalším krokem je vyčištění či zpřesnění (tzv. polishing) složených sekvencí pomocí surových čtení, například pomocí nástrojů jako Medaka (Oxford Nanopore Technologies) nebo Racon [31].

Pro data získaná sekvenátory firmy Pacific Biosciences je vhodné použít nástroj SMRT Link, který tato firma vyvíjí a poskytuje. Tento software umožňuje kompletní zpracování dat od kontroly kvality, demultiplexaci, sestavování genomů, jeho následnou cirkularizaci, až po zpřesnění složených sekvencí.

V případě, že jsou pro daný vzorek dostupná data z obou generací sekvenování, tedy dlouhá i krátká čtení, je výhodné využít přístup hybridního sestavení genomu. Tento postup je finančně náročný (vzorek je sekvenován dvakrát), ale umožňuje využít výhody dlouhých čtení spolu s vysokou přesností krátkých čtení, a získat tak vysoce kvalitní kompletní genomy [32]. Základem je sestavení kostry genomu pomocí *de novo* skládání za využití dlouhých čtení. Následně jsou složené sekvence použity jako reference pro mapování krátkých čtení. Nástroje, které umožňují provést hybridní sestavování, jsou například SPAdes [33] či Unicycler [34].

Jelikož většinu uvedených softwarů a nástrojů je nutné ovládat přes příkazový řádek, a to navíc v operačním systému Linux, vyžaduje jejich použití určité programátorské znalosti. Běžný uživatel může využít komerční softwaru, které většinou mají interaktivní prostředí, jako jsou CLC Workbench, Ridom SeqSphere+ nebo Geneious. Licence pro tyto softwary jsou ovšem většinou zpoplatněny. Jednou z možných alternativ je použití nástroje UGENE [35], který je zdarma, a jeho nespornou výhodou jsou také pravidelné aktualizace.

Tabulka 2
Shrnutí analýz dat získaných celogenomovým sekvenováním na principu hledání konkrétních genetických determinant

Análýza	Název aplikace	Organismus	Princip	Webová platforma*
Typizace	MLST spaTyper	148 různých organismů <i>S. aureus</i>	stanovení alel 5–8 housekeepingových genů strukturální kompozice genu pro stafylokokový protein A	CGE CGE
	SCCmecFinder	MRSA	strukturální kompozice stafylokokové chromozomové kazety <i>mec</i> (SCCmec) a <i>ccr</i> genů	CGE
	pMLST	–	strukturální kompozice plasmidů	CGE
Hledání genů antibiotické rezistence	CARD	377 různých organismů	identifikace získaných genů rezistence nebo chromozomových bodových mutací vedoucích k antibiotické rezistenci, predikce fenotypu, různé vizualizace a zpracování dat	CARD
	ResFinder	<i>Campylobacter</i> spp., <i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. pylori</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>M. tuberculosis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. epidermidis</i>	identifikace získaných genů rezistence nebo chromozomových bodových mutací vedoucích k antibiotické rezistenci	CGE
	Pasteur database	<i>B. pertussis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. epidermidis</i>	identifikace získaných genů rezistence	BIGSdb-Pasteur
	LRE-finder	<i>Enterococcus</i> spp.	identifikace genů kódujících rezistenci k linezolidu u enterokoků	CGE
Hledání genů virulence	VirulenceFinder	<i>Enterococcus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	identifikace genů virulence specifických pro vybrané bakterie (např. geny <i>stx</i> pro shigatoxin, geny lukS-PV pro Panton Valentínův leukocidin a <i>tst</i> pro toxin syndromu toxického šoku)	CGE
	Pasteur database	<i>K. pneumoniae</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Yersinia</i> spp.	identifikace genů virulence specifických pro vybrané bakterie (např. gen <i>magA</i> související s mukoviskozitou u <i>K. pneumoniae</i> = K1)	BIGSdb-Pasteur
Hledání plasmidů	PlasmidFinder	Gram+/ <i>Enterobacteriales</i>	identifikace plasmidů	CGE
	pATLAS	–	identifikace a vizualizace plasmidů	pATLAS database

* CGE – Center for Genomic Epidemiology – <https://www.genomicepidemiology.org/>; BIGSdb-Pasteur – <https://bigsdbs.pasteur.fr/>; pATLAS database – <http://www.patlas.site>

Využití výsledků sekvenování nové generace v mikrobiologii

Strukturní a funkční genomika u bakterií

Data získaná celogenomovým sekvenováním lze využít pro řadu různých analýz. Jednou z hojně využívaných možností je *in-silico* vyhledávání známých genetických determinantů, k jejichž stanovení bývají standardně využívány laboratorní techniky PCR nebo Sangerova sekvenování. Tyto analýzy nám, stejně jako v případě studia lidského genomu, mohou pomoci charakterizovat mikroorganismy a identifikovat genetické elementy, jejichž přítomnost hraje roli v patogenezi, schopnosti přežít nebo antimikrobiální rezistenci. Získané poznatky pak mohou být důležité například z hlediska možnosti léčby jimi způsobených infekcí. Na rozdíl od způsobu zpracování surových sekvenáčnických dat jsou pro tyto následné analýzy vyvinuté četné online nástroje, jejichž shrnutí uvádí tabulka 2. Mezi nejvyužívanější patří nástroje dostupné prostřednictvím webového rozhraní Center for Genomic Epidemiology (CGE), které si klade za cíl zprostředkovat analýzu dat získaných z celogenomové sekvenace i laboratorním s omezenými zkušenostmi s DNA analýzou.

S rostoucími poznatky o genetické výbavě jednotlivých bakteriálních druhů a klonů vzrůstá tendence zaměřit se na cílenou detekci faktorů virulence a genů rezistence. V tomto případě je velmi výhodné tyto jednotlivé analýzy nahradit celogenomovou sekvenací. Pro vyhledávání specifických genů souvisejících s antibiotickou rezistencí a jejich alelických variant, ale také pro identifikaci získaných genů rezistence nebo chromozomových bodových mutací vedoucích k antibiotické rezistenci, slouží například nástroje ResFinder [36], nebo velmi rozsáhlá databáze Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [37]. Nejnovější verze nástroje ResFinder poskytuje snadno interpretovatelný *in silico* antibiogram pro osm bakteriálních druhů, včetně grampozitivních i gramnegativních bakterií s velkým významem pro veřejné zdraví. Speciální nástroj LRE-finder [38] umožňuje detekci mutací determinujících rezistenci k linezolidu. Databáze CARD obsahuje referenční sekvenace DNA a proteinů vedoucích k rezistenci a umožňuje vyhle-

dávání na principu BLAST. Zároveň umožňuje stanovení sekvenčních variant u detekovaných genů rezistence a predikci rezistentního fenotypu. V současnosti obsahuje více než 5 000 referenčních sekvencí pro 377 patogenů. Vyhledání genů virulence je oproti vyhledávání determinantů antibiotické rezistence náročnější, protože podíl celé řady genů na patogenitě kmenů, které je nesou, není často jednoznačný. Pro rody *Listeria* a *Enterococcus* a druhy *E. coli* a *S. aureus* lze využít nástroj VirulenceFinder [39], pro několik dalších pak databázi na stránkách Pasteurova institutu, viz tabulka 2.

Kromě chromozomální bakteriální sekvenace je možné studovat i sekvence (zejména velkých) plazmidů, které lze v datech z celogenomového sekvenování identifikovat. Pro tyto analýzy lze s výhodou použít dlouhá čtení, případně jejich kombinaci s krátkými čteními. Použití pouze krátkých čtení je ve většině případů odkázáno na mapování k referenci se všemi výhodami i nevýhodami tohoto přístupu. Plazmidy jsou často nositeli genů rezistence k antibiotikům, rezistence k těžkým kovům, produkce toxinů a dalších látek, kterými se bakterie přizpůsobují vnějšímu prostředí. Pro identifikaci plazmidů lze využít nástroj PlasmidFinder [40] nebo pATLAS [41]. Následně lze plazmidy typizovat např. pomocí pMLST [40], kde je aktuálně dostupných 8 typizačních schémat. Pokud máme genomy, případně plazmidy, složené, je možné je následně anotovat, tzn. vyhledat a označit významná místa. Během tohoto procesu se predikují proteinkódující geny a další zájmové oblasti, jako jsou rRNA, tRNA, ncRNA či pseudogeny. Pro tento účel lze využít např. Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [42] spravovanou NCBI nebo nástroj Prokka [43]. Výsledné anotace jsou uloženy v souborech ve formátech Genbank nebo GFF3 a lze je vizualizovat, např. pomocí nástrojů Artemis [44] nebo Clinker [45]. U zobrazených anotovaných genomů lze, kromě vizuální podobnosti, hodnotit i různé strukturní přestavby jednotlivých genomických oblastí (inverze, delece, inserce).

Molekulární epidemiologie bakterií

Další možností, kterou nám celogenomové sekvenování umožňuje, je vzájemné porovnávání genomů na různé úrov-

Tabulka 3
Srovnání metod využívaných pro typizaci bakterií

Metoda	Princip	Diskriminační schopnost	Cena	Reproducibilita
PFGE	srovnávání produktů restriční štěpení	oo	o	o
MLST	stanovení alel 5–8 housekeepingových genů	o	oo	oooo
cgMLST	stanovení alel stovek až tisíců jádrových genů	ooo	ooo	oooo
wgMLST	stanovení alel stovek až tisíců jádrových a doplňkových genů	ooo	ooo	ooo
SNV	stanovení jednonukleotidových záměn	oooo	ooo	ooo

PFGE – pulzní gelová elektroforéza, MLST – multilokusová sekvenáčnická typizace, SNV – analýza jednonukleotidových variant polymorfizmů, cgMLST – core-genome MLST, MLST analýza jádrového genomu, wgMLST – whole-genome MLST, MLST analýza celého genomu

ni s využitím mnohem vyššího počtu genů než základní stanovení sekvenčního typu pomocí MLST. Je možné provést analýzu jádrového genomu (cgMLST; z angl. core-genome MLST), analýzu pan-genomu (wgMLST; z angl. whole-genome MLST) anebo až analýzu jednonukleotidových změn (SNV; z angl. single nucleotide variant). Pro srovnání je nejčastěji využíváno mapování k referenční sekvenci, přičemž se může jednat o univerzální veřejně dostupnou sekvenci nebo vlastní *de novo* složenou referenci.

cgMLST

Metoda cgMLST je obdobou konvenční MLST, kdy se namísto alel typicky 7-8 genů porovnávají alely stovek až tisíců jádrových (core) genů, tedy genů přítomných ve všech kmenech daného druhu. Získaná data jsou hodnocena na základě druhově specifických cgMLST schémat. Tato schémata obsahují soubor všech konzervovaných jádrových genů a referenčních genomů. Pomocí cgMLST se stanoví počet alelových rozdílů mezi testovaným izolátem a referencí, z čehož je možné odvodit genetickou příbuznost izolátů. Je možné definovat mezní hodnotu alelových rozdílů, která stanovuje horní hranici pro zařazení do klastru příbuzných izolátů. Mezní hodnota není v literatuře uváděna jednotně, liší se v rámci jednotlivých bakteriálních druhů a také mezi autory. V porovnání s konvenční MLST poskytuje cgMLST vyšší diskriminační schopnost, a umožňuje tak studium blízce příbuzných izolátů na hlubší úrovni. Toho lze s výhodou využít při stanovování fylogenetické příbuznosti izolátů nebo prakticky při vyšetřování outbreaků v nemocničních zařízeních. Další výhodou je možnost mezilaboratorního srovnávání díky veřejně dostupným cgMLST schématům (např. cgMLST.org), je však nutné brát v potaz i jejich možnou nekonzistenci, kdy existuje pro jeden bakteriální druh více různých schémat.

wgMLST

Na wgMLST lze nahlížet jako na rozšířenou verzi cgMLST. Pro analýzu využívá jak jádrové geny, tak všechny přídatné (accessory) geny. Jedná se o geny, které jsou specifické pro daný druh, avšak jejich přítomnost se mezi jednotlivými kmeny může lišit. Výhodou této metody je zvýšení rozlišovací schopnosti oproti cgMLST o další stovky genů, ovšem za cenu obtížnějšího bioinformatického vyhodnocení a mezilaboratorního porovnání, jelikož reference pro jednotlivé epidemiologické epizody mohou být přizpůsobeny vlastním potřebám a cílové spektrum stanovovaných genů se může lišit.

SNV

SNV analýza je přístup, při kterém jsou porovnávány a zohledňovány změny na pozicích jednotlivých nukleotidů. Stejně jako v případě cgMLST neexistuje žádná pevně daná mezní hodnota počtu změn, která by definovala, že izoláty ještě patří do stejného nebo už jiného klastru [46,47]. V nejnovějších studiích je však většinou využívána mezní hodnota do 10 SNV, zřídka do 20 SNV. Čím vyšší je mezní hodnota SNV, tím vyšší je pravděpodobnost zahrnutí do klastru

i vzdálených izolátů. SNV analýza je v současné době metodou s nejvyšší diskriminační schopností, protože umožňuje zachytit všechny změny v nukleotidové sekvenci oproti referenci. Její nevýhodou v porovnání s cgMLST a wgMLST je obtížná standardizace a chybné vyhodnocení událostí horizontálního transferu, které nejsou během této analýzy vyhodnoceny jako jeden evoluční krok, nýbrž několikanásobná nukleotidová změna. Kromě komerčních programů, jako jsou Ridom SeqSphere+ nebo CLC Genomics Workbench existuje celá řada volně dostupných softwarů, ze kterých můžeme uvést například Genome Analysis Toolkit (GATK) [48], DeepVariant [49], VarNet [50], VarScan [51] nebo SAMTools [25].

Využití dat z celogenomového sekvenování pro další aplikace

Některé z dostupných aplikací se zaměřují na *in-silico* hledání přítomnosti nebo variant už popsanych genů. U celé řady mikrobusů jsou známy geny, na základě jejichž sekvence lze daný izolát blíže charakterizovat. Většinou je toto prováděno specifickou kvalitativní/real-time PCR amplifikací a detekcí daného úseku, případně pokud potřebujeme zjistit variantu daného genu doplněnou o následnou sekvenaci PCR produktu Sangerovou metodou. Typickým případem je přiřazení k tzv. sekvenčnímu typu metodou MLST. Tímto způsobem lze již nyní ze sekvenčních dat typizovat více než 150 druhů bakterií a kvasinek [36]. Získaná data jsou velmi dobře mezilaboratorně reprodukovatelná, a výsledky lze tak snadno porovnat jak na národní, tak na mezinárodní úrovni. Další příkladem je typizace bakterií druhu *S. aureus* založená na sekvenaci stafylokokového proteinu A s následnou analýzou přítomných repetitivních pomocí nástroje spaTyper [37] nebo stanovení struktury genomové kazety SCCmec (zodpovědná za rezistenci k meticilinu) a genů *ccr* pomocí SCCmec-Finder [38].

Získaná data poskytují v epidemiologických studiích velice přesnou informaci o tom, jak moc geneticky podobné jsou srovnávané genomy, a zda se jedná o nezávisle se vyskytující izoláty, např. se stejnou citlivostí k antibiotikům nebo jde o lokální klonální šíření [55]. Srovnání jejich diskriminační schopnosti je uvedeno v tabulce 3.

Implementace celogenomové sekvenace v klinické mikrobiologii

Hlavní limitací širokého použití celogenomové sekvenace je v současné době stále ještě velmi vysoká cena za pořizování přístrojového vybavení a následně i provedení analýzy, která se stále pohybuje v řádu tisíců korun. Možným řešením může být přístup ONT, která některé sekvenátory na určitou dobu zapůjčuje v rámci startovních balíčků za cenu objednané chemie. Cena za sekvenaci jednoho vzorku může být výrazně snížena současnou sekvenací mnoha kmenů v jedné analýze, to ale předpokládá jejich kumulaci na specializovaných pracovištích, kde lze očekávat pravidelně vyšší počty vzorků. Druhým úskalím je doposud omezená kontrola kvality a standardizace jednotlivých kroků, od přípravy sekvenčních knihoven, přes samotnou techniku sekvenování až po analýzu získaných dat [56,57]. V nepo-

slední řadě je nutné pro tyto techniky vytrénovat personál, a buď využít komerční analýzu získaných dat, nebo do týmu přijmout bioinformatika, který je i přes dostupnost online nástrojů pro ucelenou analýzu dat zatím zcela nezbytný. Pro zavedení do rutinní praxe je ovšem nezbytné vyvinout uživatelsky, a zejména cenově dostupné nástroje, s co největší mírou automatizace a standardizace, použitelné bez znalosti základů programování.

Závěr

I přes tato úskalí je z doposud získaných poznatků zřejmé, že celogenomová sekvenace je zcela zásadním milníkem v našem poznání a je velmi pravděpodobné, že v budoucnosti nahradí většinu tradičních typizačních technik. S mohutným rozvojem této technologie spojeným s poklesem ceny sekvenace, náročnosti prováděných metodik, a tím i dostupnosti pro méně specializovaná pracoviště, zcela jistě naroste naše schopnost vyhledávat bakteriální kmeny s nežádoucími a nebezpečnými biologickými vlastnostmi. Tím se nám otevře možnost studovat a pochopit šíření těchto bakterií v nemocničním prostředí, a v souladu s tím také schopnost zavést účinná protipatření, a chránit tak zdraví našich pacientů.

Tato práce byla finančně podpořena grantem ministerstva zdravotnictví NV19-09-00430 a institucionální podporou MZ ČR RVO FNBr, 65269705.

Literatura

- Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc.* 2007;2(3):677–684.
- Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(10):728–736.
- van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418–426.
- Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017;1525:3–33.
- Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol.* 2012;30(4):349–353.
- Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol.* 2016;17(1):239.
- Tyler A, Mataseje L, Urfano C, et al. Evaluation of Oxford Nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications. *Sci Rep.* 2018;8(1):10931.
- Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(5):278–289.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32(19):3047–3048.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–2120.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal.* 2011;17(1):10–12.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884–i90.
- Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 2018;7:1338.
- Bushnell B. BBDMap: A fast, accurate, splice-aware aligner. *Lawrence Berkeley National Laboratory.* 2014;LBNL-7065E.
- Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018;34(18):3094–3100.
- Nykrýnova M, Barton V, Bezdíček M, Lengerova M, Skutkova H. Identification of highly variable sequence fragments in unmapped reads for rapid bacterial genotyping. *BMC Genom.* 2022;23(Suppl 3):445.
- Warren RL, Sutton GG, Jones SJ, Holt RA. Assembling millions of short DNA sequences using SSAKE. *Bioinformatics.* 2007;23(4):500–501.
- Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science.* 2000;287(5461):2196–2204.
- Zerbino DR, Birney E. Velvet: Algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008;18(5):821–829.
- Luo R, Liu B, Xie Y, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *Gigascience.* 2012;1(1):18.
- Trapnell C, Salzberg SL. How to map billions of short reads onto genomes. *Nat Biotechnol.* 2009;27(5):455–457.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589–595.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9(4):357–359.
- Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics.* 2009;25(15):1966–1967.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078–2079.
- Leger A, Leonardi T. PycoQC, interactive quality control for Oxford Nanopore Sequencing. *J Open Source Softw.* 2019;4(34):1236.
- De Coster W, D'Hert S, Schultz DT, Cruets M, Van Broeckhoven C. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics.* 2018;34(15):2666–2669.
- Lanferar R, Schalamun M, Kainer D, Wang W, Schwessinger B. MinIONQC: fast and simple quality control for MinION sequencing data. *Bioinformatics.* 2019;35(3):523–525.
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive. *Genome Res.* 2017;27(5):722–736.
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol.* 2019;37(5):540–546.
- Vaser R, Sović I, Nagarajan N, Šikić M. Fast and accurate *de novo* genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Res.* 2017;27(5):737–746.
- Wee Y, Bhyan SB, Liu Y, Lu J, Li X, Zhao M. The bioinformatics tools for the genome assembly and analysis based on third-generation sequencing. *Brief Funct Genomics.* 2019;18(1):1–12.
- Antipov D, Korobeynikov A, McLean JS, Pevzner PA. hybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics.* 2016;32(7):1009–1015.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(6):e1005595.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28(8):1166–1167.
- Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491–500.
- McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3348–3357.
- Hasman H, Clausen PTLC, Kaya H, et al. LRE-Finder, a Web tool for detection of the 23S rRNA mutations in enterococci from whole-genome sequences. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(6):1473–1476.
- Joensen KG, Scheutz F, Lund O, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1501–1510.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895–3903.
- Jesus TF, Ribeiro-Gonçalves B, Silva DN, Bortolaia V, Ramirez M, Carriço JA. Plasmid ATLAS: plasmid visual analytics and identifica-

- tion in high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1):D188–D94.
42. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6614–6624.
 43. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;30(14):2068–2069.
 44. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* 2000;16(10):944–945.
 45. Gilchrist CLM, Chooi YH. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics.* 2021;btab007.
 46. Bezdicek M, Nykrynova M, Plevova K, et al. Application of mini-MLST and whole genome sequencing in low diversity hospital extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* population. *PLoS One.* 2019;14(8):e0221187.
 47. Baert L, McClure P, Winkler A, Karn J, Bouwknegt M, Klijn A. Guidance document on the use of whole genome sequencing (WGS) for source tracking from a food industry perspective. *Food control.* 2021;130:108148.
 48. Van der Auwera GA, O'Connor BD. Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra (1st Edition). *O'Reilly Media.* 2020.
 49. Poplin R, Chang PC, Alexander D, et al. A universal SNP and small-indel variant caller using deep neural networks. *Nat Biotechnol.* 2018; 36:983–987.
 50. Krishnamachari K, Lu D, Swift-Scott A, et al. Accurate somatic variant detection using weakly supervised deep learning. *Nat Commun.* 2022; 13:4248.
 51. Koboldt DC, Zhang Q, Larson EL, et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22:568–576.
 52. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4): 1355–1361.
 53. Bartels MD, Petersen A, Worning P, et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4305–4308.
 54. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12): 4961–4967.
 55. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):350–354.
 56. Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogstraal DR, Cookson BT. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4): 1072–1079.
 57. Simar SR, Hanson BM, Arias CA. Techniques in bacterial strain typing: past, present, and future. *Curr Opin Infect Dis.* 2021;34(4): 339–345.

Respirační projevy post-covid syndromu

J. MIZERA¹, P. JAKUBEC¹, M. SOVA^{1,2}, M. VYKOPAL¹, P. POBEHA³, S. GENZOR^{1,4}

¹Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, LF UP a FN Olomouc;

²Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, LF Masarykova Univerzita a FN Brno;

³Klinika pneumologie a ftizeologie, Univerzitní nemocnice L. Pasteura, Košice

⁴Centrum digitálního zdravotnictví, LF UP a FN Olomouc

SOUHRN

Mizera J., Jakubec P., Sova M., Vykopal M., Pobeha P., Genzor S.: **Respirační projevy post-covid syndromu**

Po onemocnění covid-19 (coronavirus 2019) přetrvávají u části pacientů potíže různého charakteru. Symptomy, které jsou kauzálně spojeny s postižením po infekci SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-2) jsou označovány jako postcovidový syndrom. Z plicních potíží je nejčastěji popisován vznik fibrózního postižení (zejména po prodělaném kritickém průběhu onemocnění). U části pacientů jsou postiženy pouze periferní dýchací cesty s popisovaným air-trapíngem dle HRCT plic. Méně časté respirační komplikace zahrnují rozvoj sarkoidózy a pneumatokél. Tento přehledový článek shrnuje aktuální znalosti o plicním postižení v rámci post-covid syndromu.

Klíčová slova: post-covid syndrom, plicní postižení, léčba

SUMMARY

Mizera J., Jakubec P., Sova M., Vykopal M., Pobeha P., Genzor S.: **Respiratory manifestations of post-COVID syndrome**

Overcoming infection with coronavirus disease 2019 (COVID-19) can lead to the persistence of various symptoms in some patients. The complex of symptoms causally related to severe acute respiratory coronavirus 2 infection is called post-COVID syndrome. One of the most common respiratory complications is pulmonary fibrosis, especially after critical course of the disease. In some patients, however, only the peripheral airways are affected by the air-trapping seen on high-resolution computed tomography scans. Less common respiratory complications include sarcoidosis and pneumatoceles. This narrative review summarizes current knowledge about pulmonary involvement as part of post-COVID syndrome.

Keywords: post-COVID syndrome, pulmonary involvement, therapy

Klin mikrobiol inf lék 2022;28(4):116–128

Adresa: MUDr. Samuel Genzor, Ph.D., Klinika plicních nemocí a TBC, FN Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika, e-mail: samuel.genzor@fnol.cz

Došlo do redakce: 19. 11. 2022

Schváleno k tisku: 3. 2. 2023

Post-covid syndrom – úvod a definice pojmů

Pandemie covid-19 (coronavirus disease 2019) zasáhla do všech oblastí lidského života. Část pacientů si do dalšího života ponese následky tohoto onemocnění. Postcovidové komplikace jsou definovány jako: a) symptomy, které ve vztahu k akutní infekci perzistují, zhoršují se, recidivují, nebo se nově objevují; b) zhoršení kvality života nebo funkčního stavu ve srovnání s obdobím před proděláním covid-19; c) přítomnost jinak nevysvětlitelných perzistujících nebo progredujících patologických orgánových nálezů při zobrazovacích, laboratorních, či funkčních vyšetřeních [1,2].

Termín „perzistující post-covid syndrom“ (Persistent Post-COVID Syndrome, PPCS) [3] je definovaný jako patologická entita, zahrnující fyzické, zdravotní a kognitivní následky covid-19 infekce, včetně perzistujícího imunopresivního stavu a fibrózního postižení plic, srdce a cévního systému. Tento prolongovaný imunoparalytický a pro-fibrotický stav vede ke zvýšené zranitelnosti sekundárními infekcemi a orgánovými dysfunkcemi i po zdánlivém uzdravení z akutní covid-19 infekce. Při covid-19 infekci dochází k excesivnímu rozvoji syndromu systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) s vysokými hladinami

Tabulka 1
Přehled příznaků post-akutní fáze covid-19 (upraveno podle [7])

Příznaky post-akutní fáze covid-19	Výskyt [%; 95 % CI]	Příznaky post-akutní fáze covid-19	Výskyt [%; 95 % CI]
Systémové		Neurologické a neuromuskulární	
Únava	30,97 (23,91–39,03)	Bolesti hlavy	4,88 (2,30–10,06)
Slabost	41,20 (25,43–59,01)	Třes	3,53 (0,30–30,63)
Horečka	1,08 (0,24–4,66)	Záchvaty/křeče	1,33 (0,49–2,87)
Denní či noční pocení	23,72 (20,68–27,05)	Bradykineze	5,19 (2,11–10,39)
Lymfadenopatie	0,89 (0,24–2,26)	Porucha koordinace/dysmetrie	1,48 (0,18–5,25)
Nevolnost	32,68 (14,91–57,36)	Svalová atrofie	6,67 (3,09–12,28)
Kardiopulmonální		Abnormální svalový tonus	4,44 (1,65–9,42)
Dušnost klidová či námahová	25,06 (17,86–33,97)	Porucha chůze	4,20 (2,02–8,53)
Kašel	8,17 (4,85–13,44)	Porucha chuti	13,52 (8,96–19,89)
Expektorace	5,46 (3,19–9,19)	Porucha čichu	15,17 (10,75–20,97)
Bolest na hrudi	6,36 (3,15–12,42)	Porucha sluchu	1,11 (0,36–2,57)
Palpitace	9,67 (5,95–15,34)	Porucha visu	4,78 (3,32–6,83)
Návaly horka/flush	4,83 (3,18–7,00)	Porucha řeči/dysartrie	2,22 (0,46–6,36)
Nově diagnostikovaná hypertenze	1,30 (0,52–2,66)	Porucha citlivosti/čítí	10,90 (6,71–17,22)
Ostatní kardiovaskulární příznaky	1,38 (0,01–67,44)	Parestezie	9,12 (2,21–30,87)
Horní cesty dýchací		Neuralgie trigeminu	3,28 (0,90–8,18)
Bolest v hrdle	4,70 (2,42–8,91)	Abnormality reflexů	22,96 (16,17–30,98)
Ucpaný nos	4,99 (2,73–8,92)	Ostatní neurologické příznaky	14,81 (9,29–21,95)
Změna hlasu	8,21 (4,17–14,21)	Psychologické a sociální	
Ostatní respirační příznaky	15,58 (0,68–83,17)	Úzkost	18,73 (8,89–35,25)
Gastrointestinální		Deprese	8,06 (4,14–15,10)
Nevolnost nebo zvracení	6,69 (1,64–23,59)	Porucha spánku	18,15 (9,61–31,63)
Průjem	4,00 (2,07–7,57)	PTSD	9,14 (3,66–21,04)
Nechutenství	17,49 (4,13–51,04)	Špatná nálada/dysforie	1,79 (0,00–98,74)
Bolest žaludku/břicha	2,33 (0,54–9,42)	Snížená kvalita života	36,76 (18,43–59,93)
Břišní diskomfort	17,95 (11,47–26,12)	Závislost na pomoci jiné osoby	5,89 (0,46–45,96)
Hubnutí	20,99 (8,09–44,51)	Neuro-kognitivní	
Krev ve stolici/hematochézie	1,71 (0,21–6,04)	Porucha paměti	17,94 (5,26–46,25)
Muskuloskeletální		Porucha soustředění	25,98 (20,96–31,73)
Bolest svalů	11,29 (6,17–19,75)	Zmatenost	2,71 (1,93–3,79)
Bolest kloubů	9,39 (5,72–15,03)	Symptomy čelního laloku	14,81 (9,29–21,95)
Zhoršená pohyblivost	14,42 (4,67–36,73)	Jiná kognitivní porucha	17,77 (0,08–98,23)
Ostatní			
Kožní vyrážka	2,83 (0,95–8,16)		
Padání vlasů	14,34 (5,33–33,23)		
Konjunktivitida	1,77 (0,77–3,47)		

PTSD = posttraumatic stress disorder (post-traumatická stresová porucha)

nami prozánětlivých cytokinů. Organismus reaguje rozvojem syndromu kompenzatorní protizánětlivé odpovědi (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS) ve snaze dosáhnout rovnováhy. Pokud je ale tato protizánětlivá odpověď neadekvátně vysoká, dochází k protrahované imunosupresi, známé pod termínem PICS (persistent inflammation, immunosuppression, catabolic syndrome). Toto je jedna ze zvažovaných příčin postcovidových komplikací. Pacienti jsou ve zvýšeném riziku bakteriálních a mykotických infekcí a jsou také náchylní ke vzniku plicní fibrózy [2,4].

Příznaky přetrvávající po prodělání akutní fáze covid-19 mohou být velmi různorodé co do povahy, intenzity i trvání. Velmi často jde o chronickou únavu, zhoršení tolerance fyzické i psychické zátěže, nevolnost, dušnost a poruchu soustředění [5]. Další příznaky zahrnují trvající horečku, kašel, bolesti na hrudi, palpitace, bolesti hlavy, potíže se spánkem, mžitky, parestezie, trvající poruchu chuti nebo čichu, deprese, úzkost, chronický průjem, bolesti žaludku, bolesti kloubů nebo svalů, vyrážku, změny menstruačního cyklu, nebo další, leckdy obtížně uchopitelné a zvladatelné symptomy. Ve vyšším riziku vzniku chronických potíží po prodělání covid-19 jsou pacienti, kteří vyžadovali v akutní fázi onemocnění hospitalizaci. Prevalence déle než rok přetrvávající poruchy chuti a/nebo čichu byla nízká, podobně jako přetrvávající gastrointestinální potíže [5,6]. Podrobný přehled symptomů post-covid je uveden v *tabulce 1*.

Kolektiv autorů Skála et al. navrhl schéma klasifikace post-covid syndromu, který byl následně adaptován v doporučení České pneumologické a fteziologické společnosti (ČPFS) [1,8]. Tato klasifikace stratifikuje pacienty do kategorií A–D dle přítomnosti nebo nepřítomnosti subjektivních příznaků a objektivních nálezů na zobrazovacím či funkč-

ním vyšetření plic. Do skupiny A jsou řazeni pacienti bez přetrvávajících subjektivních příznaků a objektivních známek plicního postižení. Skupinu B tvoří pacienti se subjektivními příznaky plicního postižení, ale s negativním radiologickým nálezem a normálními funkcemi plicními parametry. Pacienti ve skupině C sice nepocítují subjektivní obtíže, ale jsou u nich detekovatelné objektivní známky plicního postižení. Skupina D zahrnuje pacienty se subjektivními i objektivními příznaky plicního postižení. Zvlášť je hodnocena přítomnost extrapulmonálních příznaků či nálezu (kategorie E) [8]. Užitečnost této stratifikace autoři demonstrovali na předběžných datech z prospektivní studie sledující po dobu jednoho roku pacienty po prodělání covid-19. Šlo o 102 pacientů (55 žen), kteří byli v rámci akutního onemocnění covid-19 v průběhu jara 2020 vyšetřeni na Plicní klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové, kde byli léčeni ambulantně (n = 87), či za hospitalizace (n = 15). Průměrný věk v kohortě byl 46,7 let, v 75 % šlo o pacienty bez komorbidit. Publikována jsou zatím předběžná data z kontroly v odstupu tří měsíců od akutní fáze onemocnění covid-19. Prevalence přetrvávajících plicních příznaků byla 35 % (23 % dušnost, 14 % kašel, 13 % bolest na hrudi), mimoplicní příznaky přetrvávaly v 47 % (21,6 % únava, 20,6 % anosmie, 6,9 % ageusie, 5,9 % bolesti hlavy, 4,9 % poruchy paměti, 3,9 % artralgie či myalgie, 2 % konjunktivitidy, 2 % dyspepsie, 1 % subfebrilie, 13,7 % jiné příznaky. Snížení parametrů plicní difuze bylo pozorováno u 60 % pacientů. Mezi patologickými nálezy na HRCT (high-resolution computed tomography, počítačová tomografie s vysokým rozlišením) hrudníku dominoval air-trapping (32 %), dále lineární opacity (11 %), známky fibrózy (6 %) a konsolidace (2 %). Laboratorně byla patrná elevace d-dimerů u 10 % pacientů – u všech byla následně vyloučena plicní embolie pomocí CT angiografie plicnice. Perzistující elevace CRP (C-reaktivního proteinu) svědčila pro přetrvávající zánětlivou aktivitu u 11 % pacientů. Zastoupení pacientů v kategoriích A–D bylo 23 %, 8 %, 46 %, resp. 23 % u ambulantně léčených pacientů, a 13 %, 0 %, 33 %, resp. 54 % u pacientů, kteří vyžadovali hospitalizaci. Přítomnost mimoplicních příznaků (skupina E) byla 43 % u ambulantních, resp. 67 % u hospitalizovaných pacientů [8]. Tíže průběhu covid-19 ve skupině A–D korelovala s věkem pacientů a naopak nekorelovala s pohlavím, BMI a kuřáctvím. Ve skupinách C a D byla tendence k častějšímu výskytu hyperzánětlivého a hyperkoagulačního stavu. U symptomatických skupin (B a D) byla pak větší míra úzkosti a deprese (Beckův a Zungův dotazník). Klíčovým výstupem je tedy přetrvávání subjektivních a objektivně podložených známek u větší části pacientů po hospitalizaci pro covid-19, ale rovněž fakt, že pouze minimum pacientů mělo při přetrvávajících respiračních příznacích negativní plicní nálezy, což znamená, že přetrvávání příznaků plicního postižení v post-covid fázi onemocnění nelze za žádných okolností bagatelizovat, a že tito pacienti vyžadují komplexní pneumologické vyšetření. Zvláštní pozornost by však měla být věnována pacientům s objektivními známkami plicního postižení při současném chybění respiračních symptomů (skupina C), neboť existuje možné riziko, že se u nich s latencí rozvine symptomatické postižení. Dále studie podtrhuje nutnost zaměření se i na mimoplicní příznaky [8].

Tabulka 2
Prevalence pozánětlivých intersticiálních změn
po virových infekcích

Etiologie	Prevalence
ARDS bez ohledu na etiologii	25 % [12]
covid-19	34 % [14], 20 % [15]
Pneumonie při chřipce H1N1	žádná [12]
Pneumonie při chřipce H7N9	22 % [12]
SARS	62 % [19]
MERS	33 % [19]
HTLV	61,3 % [42]
HIV	29,4 % [42]

ARDS = adult respiratory distress syndrome; MERS = middle east respiratory syndrome; HTLV = human T-lymphocyte virus; HIV = human immunodeficiency syndrome

Post-covid postižení dýchací soustavy

Postižení plic, průdušek a mediastina po proděláním covid-19 je do jisté míry heterogenní. Níže budou probrány nejčastější nálezy. Další text je rozdělen do samostatných podkapitol ke zlepšení přehlednosti.

1 Plicní fibróza

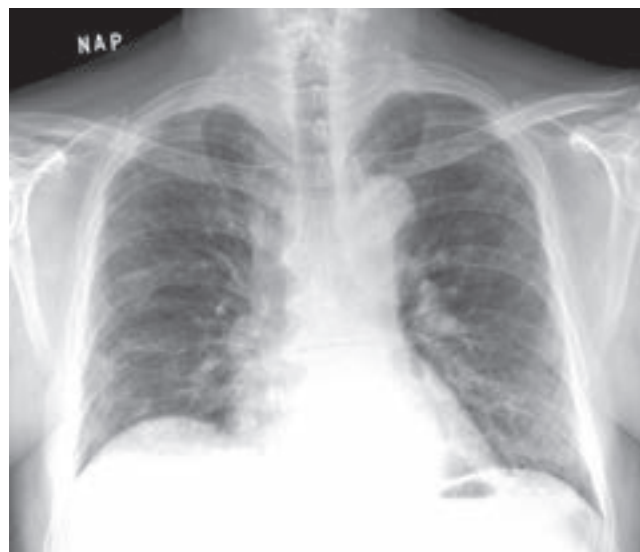
1.1 Mechanismus vzniku

Mechanismy poškození plic a dolních dýchacích cest v prvních fázích akutního onemocnění, do doby vytvoření neutralizačních protilátek, vyplývají nejspíše z rychlé replikace a přímé cytotoxicity viru. Během prvních týdnů se rozvíjí akutní zánět charakterizovaný otokem, hyperplazií pneumocytů, tvorbou infiltrátů a fibrinózního exsudátu. V následující pozdní fázi imunitní odpovědi jsou T-lymfocyty, monocyty a neutrofilové uvolňovány četné cytokiny, které mohou vyvolat lokální a při dostatečné intenzitě také systémovou zánětlivou odpověď [5]. V rámci pneumonie nalézáme na skiagramu hrudníku nejčastěji oboustranné infiltráty v plicním parenchymu, častěji více bazálně. Nález na skiagramu může však být také negativní. Na výpočetní tomografii (computed tomography, CT) plic mají pneumonické infiltráty vzhled opacit mléčného skla (ground glass opacities, GGO), cárovitých, měkkých infiltrací, či v těžkých případech obraz „crazy paving“. Po dvou týdnech mohou vznikat konsolidace [9]. Mezi další nálezy na CT patří dilatace plicních cév, subpleurální lineární opacities, reverzní haló (příznak atolu), rozšíření stěny průdušek, či mediastinální lymfadenopatie [5]. Rozbory bioptických a sekčních preparátů pacientů zemřelých v souvislosti s covid-19 vyvolaným ARDS (Acute respiratory distress syndrome) odhalily difuzní alveolární poškození, tvorbu hyalinních membrán, difuzní ztlusnění alveolární stěny, interalveolární fibrinová depozita, nekrózu a apoptózu pneumocytů a infiltraci dýchacích cest mononukleárními a makrofágy, okluzi bronchů hlenovými zátkami a poškození bronchiální výstelky. V plicních cévách byly nalézány makroskopické i mikroskopické tromby a okrsky cév uzavřených proliferacemi vzniklými neefektivní neoangiogenezí [5].

Mechanismus vzniku plicní fibrózy po proděláním covid-19 není doposud zcela objasněn, ale předpokládá se, že je obdobný jako u plicních fibróz z jiných příčin. Vlivem přímé virové toxicity, vyprovokovaného zánětu a bakteriální superinfekce, vedoucí v krajním případě až k rozvoji ARDS, vznikají v plicní tkáni mikrotraumata. Podíl na poškození plicní tkáně může být u těžkých pneumonií též iatrogenní vlivem toxicity podávané oxygenoterapie, vlivem ventilátorového postižení při umělé plicní ventilaci (UPV; VILI-Ventilator Associated Lung Injury, tedy ventilátorem asociované poškození plic) [10], či tzv. „sebepoškození plic“ v důsledku kombinace spontánní hyperventilace, nadměrného úsilí a napětí plicního parenchymu (P-SILI – patient self-inflicted lung injury) [2]. Poškozené alveolární epiteliální buňky secernují růstové faktory a signální molekuly, které do místa zánětu přitahují fibroblasty a podporují jejich diferenciaci v myofibroblasty. Alveolární epitelie a komplexy fibroblast-myofibroblast produkují metaloproteinázy 2 a 9, které dále poškozují bazální membránu a umožňují migraci

Obr. 1

Skiagram hrudníku:
hrubé pruhy a retikulace v periferii obou plicních křídel



fibroblastů-myofibroblastů do plicních alveolů. V místě takto probíhajícího fibrogenního zánětu dochází navíc k aktivaci koagulační kaskády. Děje se tak převážně vnější cestou, nezávislou na přítomnosti tkáňového faktoru. Fibroblasty i myofibroblasty secernují množství extracelulárních proteinů, zejména kolagenů. Nerovnováha mezi kapacitou tkáňových kolagenáz a tkáňových inhibitorů metaloproteináz vede k postupnému hromadění extracelulární matrix [11], zejména kolagenu a fibronektinu [12]. Myofibroblasty dále produkují angiotensinogen a peroxid vodíku, které se účastní procesu buněčné smrti alveolárních epiteliálních buněk, což ztěžuje re-epitelizaci alveolárního povrchu [11]. Specifikem v případě covid-19 je down-regulace ACE-2 (angiotenzin-konvertující enzym) receptorů na povrchu napařených buněk, čímž dochází k zvýšení koncentrace angiotenzinu II, silného vazokonstriktoru, který se přímo účastní v rozvoji zánětu a fibrózy aktivací tkáňového růstového faktoru beta 1 (TGF-β1), tvorbou kyslíkových radikálů a stimulací tvorby interleukinů 1 a 6 (IL-1, IL-6) [13].

1.2 Epidemiologie

Dle korejské metaanalýzy 30 systematických review [14] byla úhrnná prevalence post-covid změn na CT hrudníku (fibrózní změny a opacities mléčného skla) v období 6–12 měsíců od akutního onemocnění 34 % (95 % CI 22–44 %). Zastoupení pacientů po těžkém a kritickém průběhu covid-19 bylo 67 ± 28 % a 33 ± 22 %. Prevalence fibrózních změn byla signifikantně pozitivně asociována s tíží onemocnění covid-19, věkem, méně s kuřáckým statusem.

V italské kohortě 220 konsekutivních pacientů [15] byla zjištěna 20% prevalence plicní fibrózy v odstupu 6 měsíců po proděláním covid-19 pneumonie, přičemž ve vyšším riziku protrvávání plicní fibrózy byli pacienti, u kterých byly v akut-

ní fázi onemocnění těžší známky zánětu na CT plic (alveolární skóre, skóre opacit a intersticiální skóre; odds ratio 14,87, CI 1,25–175,8). Srovnání prevalence plicní fibrózy po různých virových infekcích je uvedeno v *tabulce 2*. Ještě nižší prevalence známek plicní fibrózy byla pozorována ve výše zmíněné kohortě z Hradce Králové [8], kde byly na HRCT hrudníku zaznamenány lineární opacity (11 %), známky fibrózy (6 %) a konsolidace (2 %).

Obr. 2

Skiagram hrudníku:

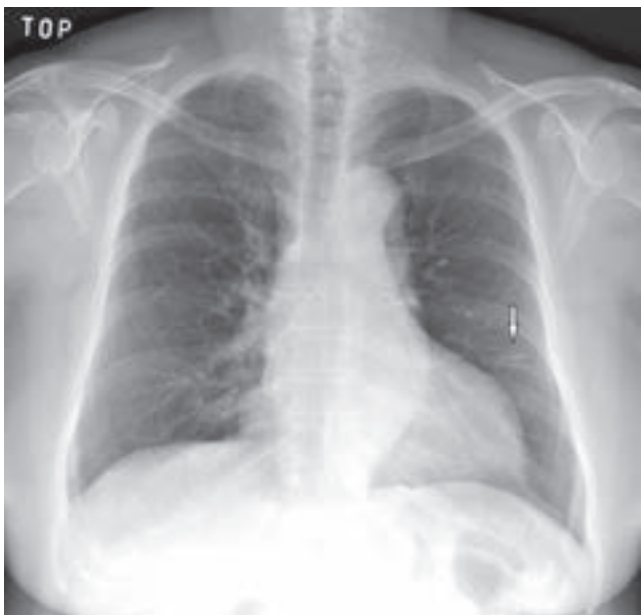
Opacity mléčného skla bilaterálně v plicním parenchymu



Obr. 3

Skiagram hrudníku:

Ploténková atelektáza ve středním plicním poli vlevo



1.3 Radiologický obraz

Co se týče zobrazovacích metod, nalézáme na skiagramech hrudníku po 12 týdnech od prodělání covid-19 pneumonie pozánětlivé změny (retikulární opacity, periferní atelektázy, opacity mléčného skla, případně obraz organizující se pneumonie) ve 36 % případů (*obr. 1–3*). Tyto změny jsou u 30 % stále patrné po 6 měsících sledování [16]. Jak již bylo výše zmíněno, na HRCT plic nacházíme pozánětlivé změny a známky plicní fibrózy u téměř 45 % pacientů po covid-19 pneumonii, je tedy zřejmé, že část změn na skiagramu hrudníku uniká pozornosti a jsou odhaleny až na HRCT plic. Nejčastěji při tomto vyšetření nalézáme obraz parenchymových pruhů, GGO a zesílení interlobulárních sept. Přehled četnosti záchytu různých radiologických obrazů na skiagramu hrudníku a HRCT plic viz *tab. 3*. Výskyt GGO (34 %) a známek intersticiálního plicního postižení (32 %) na HRCT dle metaanalýzy kolektivu Lee et al. signifikantně neklesá po 6 až 12 měsících [17]. Autoři Huntley et al. [18] upozorňují, že s interpretací dlouhodobého vývoje plicní fibrózy po covid-19 je třeba ještě vyčkat a dále pacienty systematicky sledovat. V případě SARS (severe acute respiratory syndrome) a MERS (middle-east respiratory syndrome) totiž také docházelo k signifikantní resorpci intersticiálních změn plic až v horizontu kolem 18 měsíců.

1.4 Funkční plicní parametry

Z hlediska funkčního vyšetření plic vyplývá, že statické a dynamické plicní objemy jsou alterované jen u menšiny pacientů. Nacházíme redukcí vitální kapacity plic (VC) u 27 % a redukcí celkové plicní kapacity (TLC) u 11 % pacientů s přetrvávající dušností [21]. Vzhledem k tomu, že většina publikovaných studií neudávala spolu s transfer faktorem (DLCO) parametry transfer koeficientu (KCO) a alveolární objem (VA), nelze se spolehlivě vyjádřit k etiologii restriktivního vzorce. Zdá se však pravděpodobné, že u podstatné části pacientů půjde o extrapulmonální restrikcii na vrub deondice a svalové slabosti. [22]. Nejčastějším obrazem plicního postižení po prodělání covid-19 je pokles DLCO. Hodnoty DLCO jsou v pásmu normy u prakticky všech pacientů po mírném průběhu covid-19. Snížení DLCO pozorujeme u 33 %, 54 % a 55 % pacientů po středně těžkém, těžkém, respektive kritickém průběhu onemocnění [22]. U třetiny pacientů došlo po 3 měsících k normalizaci DLCO, zatímco snížení VC přetrvávalo u 22 % a snížení TLC setrvalo na 11 % [21]. Čínská [23] studie sledovala 94 pacientů (51 lehký nebo středně těžký průběh, 43 těžký nebo kritický průběh) rok po prodělání covid-19 a došla k závěru, že snížení DLCO přetrvávalo i po roce sledování u 10 % sledovaných, objem vydechnutý během první vteřiny usilovného výdechu (FEV_1) byl abnormální u 17,8 %, Tiffeneau index (FEV_1/VC) u 10 %, TLC u 5,7 %. Pozoruhodné je, že mezi třetím a 12. měsícem od prodělání covid-19 sice došlo u pacientů k významné úpravě DLCO, avšak statické a dynamické plicní objemy se v tomto horizontu již dále neměnily.

O první rozsáhlejší studii dopadů covid-19 na plicní funkci a toleranci zátěže se postaral italský tým autorů [24], který sledoval 379 pacientů po dobu 4 měsíců po prodělání covid-19, a zaznamenal signifikantně nižší hodnoty usilovné

vitální kapacity (FVC) a TLC u pacientů po covid-19 pneumonii ve srovnání s pacienty bez pneumonie. U pacientů po invazivní mechanické ventilaci byly zaznamenány signifikantně nižší hodnoty KCO, TLC a FVC ve srovnání s pacienty s pneumonií nevyžadující UPV. Autoři upozorňují na důležitost uvádění výsledků KCO spolu s DLCO a spekulují, že na vině snížení DLCO v ostatních provedených studiích, které současně neuváděly též výsledky KCO, mohla být právě snížená FVC. Toto autoři podávají provedeným vyšetřením síly respiračních svalů, kde u pacientů po středně těžkém a těžkém průběhu covid-19 bylo zaznamenáno snížení síly inspiračních svalů a snížený neuromuskulární drive, svědčící též pro možné neuromuskulární poškození. Rakouská studie potvrdila snížení FVC, TLC a DLCO u pacientů s přetrvávajícími respiračními symptomy ve srovnání s asymptomatickými jedinci [25]. Metaanalýza 18 studií s šestiměsíčním sledováním a 12 studií s ročním sledováním po proděláním covid-19 [17] udává prevalenci poškození plicní difuze 39 % po 6 měsících a 31 % po 12 měsících, snížení FVC ve 13 % a 5 %. Míra poškození plicní difuze korelovala s tíží onemocnění covid-19.

1.5 Tolerance zátěže

Ve výše zmíněné italské kohortě [24] byly u pacientů po proděláním covid-19 pneumonie, a zejména pokud došlo k progresi do ARDS, zaznamenány signifikantně nižší klidové saturace a saturace při šestiminutovém testu chůze (6-MWT). U pacientů po invazivní mechanické ventilaci byla i výrazně nižší ušlá vzdálenost během šestiminutového testu chůze (6-MWD). Výsledky norské studie [25] zkoumající toleranci zátěže u pacientů na konci akutní fáze covid-19, prokázaly při 6-MWT u den dimise z hospitalizace hyposaturaci < 90 % u 50 % hospitalizovaných pacientů. Německá studie [26] opakovala 6-MWT po 60 dnech od propuštění z hospitalizace, kdy u žádného ze 33 pacientů nezaznamenali hyposaturaci pod 90 %, avšak 79 % pacientů nebylo schopno urazit predikovanou vzdálenost a 45 % pacientů bylo pod dolním limitem normy.

1.6 Terapie

Ohledně terapie pozánětlivých změn a plicní fibrózy po proděláním covid-19 doposud neexistuje jednoznačný konsensus. Na základě zkušeností s ARDS jiných etiologií se logickou volbou zdá nasazení systémových glukokortikoidů. Jako účinné a bezpečné se jeví podávání prednisolonu v maximální dávce 0,5 mg/kg s rychlou detakcí během tří až čtyř týdnů [27], kdy dochází k normalizaci DLCO asi u třetiny pacientů spolu s alespoň parciální regresí radiologických změn. Studie iniciovaná investigátorem prospektivně srovnávala dvě dávkovací schémata šestitýdenní terapie prednisolonem. Zařazeno bylo 130 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První skupina dostávala v prvním týdnu 40 mg prednisolonu pro die, ve druhém týdnu 30 mg, ve třetím až čtvrtém týdnu 20 mg a v pátém až šestém týdnu 10 mg prednisolonu. Druhá skupina dostávala po celou dobu trvání studie stejnou dávku 10 mg prednisolonu denně. U obou skupin došlo k parciální až kompletní regresí radiologických nálezů, k úpravě funkčních parametrů a k ústupu

námahové dušnosti, přičemž nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinami [28]. U pacientů s perzistujícím respiračním selháním při post-covid plicním poškození po více než 20 dnech od propuknutí onemocnění bylo úspěšně zkoušeno podání pulzů metylprednisolonu v dávce 1 mg/kg s postupnou detakcí [29]. Částečně protichůdné byly závěry post-hoc analýzy projektu COVADIS [30]. Zde autoři analyzovali možný benefit pozdního podávání (definovaného jako podávání více než 13 dnů od počátku symptomů covid-19) systémové kortikoterapie (v dávce 1 mg prednisolonu na kg pacienta) u pacientů s ARDS (adult respiratory distress syndrome) vyvolaného SARS-CoV-2. Studie zahrnovala celkem 348 pacientů (57 v rameni s kortikoterapií, 290 bez kortikoterapie) a neprokázala žádný signifikantní benefit paušálního pozdního podávání kortikoidů (KS). Ani dle systematického review Tlayeh et al. [31] není dosud dostatečná evidence pro pozdní podávání kortikosteroidů bez selekce pacientů. Naopak, dle autorů se zdá být pravděpodobné, že protražovaná kortikoterapie u subakutního stadia covid-19 může vést k prodloužení vylučování virových částic, a tím i k delší infekčnosti pacientů. V případě více dramatických obrazů pozdní fáze onemocnění, jako je akutní fibrózní organizující pneumonie, bylo v literatuře popsáno několik případů velmi dobré odpovědi na pulzní dávky KS (1 g metylprednisolonu 3 dny po sobě) následované sestupným podáváním nižších dávek KS [32,33]. Tento postup v případě onemocnění covid-19 nebyl dosud zaveden v rutinní praxi. Někteří autoři doporučují v těchto případech pokračovat v dlouhodobém podávání nízkých dávek makrolidů jako kortikoid šetřících léků [34,35], ale evidence o tomto postupu není dosud dostatečná.

Inhalační glukokortikoidy prokázaly účinnost v akutní fázi covid-19, kdy prostřednictvím downregulace ACE-2 a inhibice enzymu PAK1 snižovaly míru plicního zánětu, avšak otázka jejich účinnosti v post-akutní fázi zůstává zatím nezodpovězena [36].

Patogeneze vzniku plicní fibrózy po onemocnění covid-19 je ve vícero aspektech podobná patogenezi idiopatické plicní fibrózy (IPF). Není tedy překvapením, že jsou značné naděje vkládány do antifibrotik pirfenidonu a nintedanibu. Tato antifibrotika navíc prokázala účinnost i při progresivních plicních fibrózách jiné etiologie než IPF. Nasazení těchto antifibrotik u post-covid plicní fibrózy je v současnosti předmětem řady výzkumů [37]. Rovněž předmětem výzkumů je i využití dalších léčiv k prevenci a léčbě post-covid plicní fibrózy, např. spironolaktону [11], treamidu, deupirfenidonu, bovhyaluronidázy, genisteinu, tetrandrinu, anluhuaxianu, stromální vaskulární frakce (cSVF) derivované z tukové tkáně, a dalších [38].

1.7 Nutnost indikace dlouhodobé domácí oxygenoterapie (DDOT)

U části pacientů přetrvává i přes prolongovanou hospitalizaci, či krátkodobou domácí oxygenoterapii, respirační insuficience s nutností indikace DDOT. Data ze Švédského národního registru z období březen až prosinec 2020 ukazují, že nedošlo k meziročnímu nárůstu počtu pacientů indikovaných k DDOT. Změnila se však struktura indikací, kdy pacienti s přetrvávající respirační insuficiencí po covid-19

tvěřili 20,5 % indikací k DDOT. Ve srovnání s DDOT indikovanou z jiných příčin bylo u pacientů po covid-19 častěji možné léčbu ukončit během prvního roku sledování (7 % vs 15 %) [39].

1.8 Transplantace plic pro plicní postižení po covid-19

Dle dat z Amerického transplantčního registru UNOS (United Network for Organ Sharing) bylo v období mezi 1. 8. 2020 a 30. 9. 2021 v transplantčních centrech zapojených států provedeno 3 039 transplantací plic, z toho 214 (7 %) bylo z důvodu perzistujícího respiračního selhání po proděláním covid-19. U 140 pacientů (4,6 %) byla transplantace plic indikována pro ARDS, u 74 pacientů (2,4 %) byla indikací plicní fibróza. Tříměsíční přežití po transplantaci bylo srovnatelné s transplantacemi provedenými z jiné indikace [40]. V říjnu 2021 byla v Česku provedena první transplantace plic z indikace přetrvávající respirační insuficience po extrémně těžkém průběhu covid-19. Šlo o 60letého, polymorbidního pacienta, který v důsledku extrémně těžkého průběhu covid-19 s devastací obou plic strávil celkem 199 dní na mimotělní podpoře oběhu. Během této doby prodělal více než 30 epizod nozokomiální infekce. Samotný průběh

transplantace byl nekomplikovaný, potransplantační období rovněž, avšak pacient po šesti měsících umírá v důsledku zdravotních komplikací, které přímo nesouvisely s transplantací plic [26].

1.9 Shrnutí a komentář

U podstatné části pacientů po proděláním středně těžkého, ale zejména těžkého a kritického průběhu covid-19 přetrvává plicní postižení pod obrazem intersticiálního plicního postižení. Toto postižení v některých případech může perzistovat i delší dobu, u malého procenta případů signifikantní intersticiální změny přetrvávají až 1 rok od proděláním covid-19. K terapii lze s úspěchem použít glukokortikoidy v dávce 0,5 mg/kg s rychlou detakcí, přičemž alternativní dávkovací schémata rovněž prokázala účinnost. Lze se tedy řídit regionálními doporučeními místních pneumologických společností. Je zkoumáno použití nejen nintedanibu a pirfenidonu jako konvenčních antifibrotik, ale předmětem výzkumu jsou i antifibrotické vlastnosti dalších molekul, např. spironolaktonu. Objem pacientů indikovaných k DDOT se s pandemií covid-19 nezvýšil, ale změnila se struktura indikací, kdy cca 20 % nyní tvoří pacienti po prodělané covid-19 pneumonii. V USA jsou aktuálně ročně prováděny stovky transplantací plic u pacientů s perzistující respirační insuficiencí po proděláním covid-19 pneumonie. Časné potransplantační výsledky jsou příznivé, srovnatelné s transplantacemi z jiných indikací.

Tabulka 3

Výskyt různých obrazů intersticiálního plicního postižení na skiagramu a HRCT hrudníku u pacientů po covid-19 pneumonii s prokázanými známkami plicní fibrózy (upraveno podle [16,19,20])

Obraz na skiagramu hrudníku [16]	Výskyt [% výskyt u pacientů se známkami post covid plicní fibrózy] [16]
Retikulární opacity či periferní atelektáza	88 %
Splývavá zastínění/opacity mléč. skla (GGO)	61 %
Malý nádech	25 %
Obraz na HRCT [19]	Výskyt [% výskyt u pacientů se známkami post covid plicní fibrózy] [19]
Retikulace	37 %
Voština	21 %
Trakční bronchiektasie	24 %
Parenchymové pruhy	83 %
Nepravidelná rozhraní	38 %
Ztluštění interlobulárních sept	58 %
Distorze plicní architektiky	25 %
Opacity mléčného skla (GGO)	73 %
Obraz sítě	14 %
Konsolidace	62 %
Crazy paving	54 %

2 Onemocnění/dysfunkce malých dýchacích cest

2.1 Radiologický obraz

V čínské studii kolektivu Huang et al. [42] byly během akutní fáze covid-19 u 35 % pacientů při HRCT vyšetření plic přítomné známky air-trappingu, u 39 % bylo patrné ztluštění bronchiální stěny. Tíže těchto projevů onemocnění malých dýchacích cest nekořelovala s tíží intersticiálního postižení plic. Na kontrolních HRCT plic s odstupem maximálně dvou měsíců nebyla patrná signifikantní regrese air-trappingu. K podobnému závěru došla další čínská studie, kde nedošlo k signifikantní úpravě air-trappingu po 140 dnech [43].

Studie provedená v Iowě, USA [44], zkoumala HRCT nálezy u 100 pacientů s déle než 30 dnů přetrvávajícími symptomy po proděláním covid-19 (67 % lehké průběhy, 17 % těžké průběhy, 16 % kritické průběhy s nutností hospitalizace na JIP). Studie zahrnovala též skupinu 106 spárovaných kontrol. Známky air-trappingu na HRCT plic

byly přítomny u 25,4 %, 34,6 %, respektive 27,3 % s postupně narůstající tíží průběhu covid-19, a pouze u 7,2 % zdravých kontrol. Z funkčního hlediska tíže air-trappingu na HRCT, kvantitativně hodnocená s pomocí algoritmu strojového učení, korelovala s poměrem VC/TLC.

1. Funkční plicní parametry

V malé finské kohortě 20 pacientů z helsinské megapolis [45] bylo 5,1 měsíců po proděláním těžkého ($n = 10$) či kritického ($n = 12$) průběhu covid-19 (v 10 případech s nutností intubace a mechanické ventilace) provedeno funkční vyšetření plic zahrnující spirometrii, bronchodilatační test se 400 ug salbutamolu, impulzní oscilometrické vyšetření, a opakované vyšetření frakce oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu (FENO) při různých průtocích se stanovením bronchiální a alveolární frakce. V mezidobí mezi proděláním onemocnění a vyšetřením nikdo z účastníků neužíval inhalační bronchodilatancia. Užití inhalačních či systémových glukokortikoidů není zmíněno. Z výsledků vyplývá, že po 5,1 měsících nebyly při spirometrii, ani impulzní oscilometrii patrné známky postižení periferních dýchacích cest. Pouze u jednoho pacienta byl hraniční nález (FEV_1 81 % predikovaného, Z-skóre = 1,66) svědčící pro možnou lehkou obstrukci dýchacích cest. Vyšetření FENO prokázalo u 7 pacientů (39 %) mírný eozinofilní zánět v oblasti dýchacích cest (FENO 25–50 ppb).

Brazilský tým sledoval 59 konsekutivních pacientů po proděláním covid-19 [46] (15,2 % lehký průběh; 42,4 % středně těžký průběh; 30,5 % kritický průběh s nutností hospitalizace na JIP; 11,9 % vyžadovalo invazivní mechanickou ventilaci) pomocí impulzní oscilometrie a ultrazvuku plic. Ultrazvuk plic byl prováděn dvojicí zkušených pneumologů (alespoň devítiletá zkušenost s prováděním ultrazvuku plic) v 6 definovaných bodech dle Soummer et al. [47]. Při vstupním vyšetření ve druhém měsíci po proděláním covid-19 udávalo 100 % pacientů přetrvávající dušnost a/nebo kašel (50,8 % kašel, 83,1 % dušnost). Při kontrole v pátém měsíci po akutní fázi onemocnění klesl počet pacientů udávajících symptomy kašle a/nebo dušnosti na 64,4 % (32,2 % kašel, 54,2 % dušnost). Při prvním spirometrickém vyšetření ve druhém měsíci byl abnormální výsledek zaznamenán ve 44,1 % (13,6 % lehká bronchiální obstrukce, 30,5 % lehké snížení FVC). Při druhém vyšetření došlo ke statisticky nesignifikantnímu snížení podílu abnormálních výsledků na 33,9 % (11,9 % lehká obstrukce, 22 % lehké snížení FVC) případů. Výsledky FEF25-75 byly v pásmu normy při obou vyšetřeních (86, resp. 89 % predikované hodnoty). Abnormální výsledek impulzní oscilometrického vyšetření signifikantně poklesl ze 71,2 % na 64,4 %. Při ultrazvukovém vyšetření byl sledován výskyt B-linií, splývajících B-linií, subpleurálních konsolidací a „skóre provzdušňování“ (aeration score [48]). Mezi vyšetřeními došlo k signifikantnímu snížení skóre provzdušňování, v ostatních parametrech k nesignifikantnímu snížení. V další malé brazilské kohortě byl u pacientů s potíží přetrvávajícími jeden měsíc od začátku onemocnění (lehké průběhy 27,6 %), či od dimise z hospitalizace pro covid-19 (středně těžké průběhy 61,7 %, těžké průběhy 20,7 %), zaznamenán abnormální výsledek impulzní oscilometrie v 75 % případů, přičemž u 50 % pří-

padů byl nález kompatibilní s postižením malých dýchacích cest, což ve 100 % korelovalo s obrazem air-trappingu na HRCT [49]. Italští autoři ve výše zmíněné studii [24] udávají vyšší výskyt známek postižení malých dýchacích cest u pacientů po mírném až středně těžkém průběhu covid-19 ve srovnání s pacienty po těžkém a kritickém průběhu onemocnění.

2. Terapie

Aktuálně nejsou dostupná terapeutická doporučení. U části pacientů, kde je patrný obstrukční defekt při spirometrickém vyšetření, známky bronchiální hyperreakivity, známky eozinofilního zánětu, a/nebo klinické příznaky budící podezření z možného rozvoje astmatu (námahová dušnost, perzistující kašel), je možné dle klinických zkušeností vyzkoušet inhalační glukokortikoidy. U těch pacientů, kde nálezy přetrvávají po řadu měsíců, je nakonec diagnostikováno bronchiální astma. U části těchto pacientů detailním odběrem anamnézy zjistíme, že příznaky kompatibilní s astmatem se u nich vyskytovaly již v předchorobí, ale nebyly doposud diagnostikovány [4].

3. Shrnutí a komentář

Z dostupných dat se zdá, že u významné části pacientů může i po dobu delší než 5 měsíců přetrvávat postižení malých dýchacích cest. Klasické spirometrické vyšetření nemusí defekt zachytit, lepší senzitivitu má zřejmě pulzní oscilometrie, kdy nálezy kompatibilní s postižením malých dýchacích cest těsně korelují s obrazem air-trappingu na HRCT plic. Interpretaci dat však ztěžuje relativně malá velikost publikovaných kohort a rozdílnost metodologií.

2 Sarkoidóza

2.1 Definice

Sarkoidóza je systémové zánětlivé onemocnění projevující se tvorbou nekaseifikujících epitelioidních granulomů, bez přítomnosti nekróz, s různou měrou lymfocytárního zánětu, postihující zejména nitrohruďní lymfatické uzliny a plíce, ale taktéž prakticky kterýkoliv jiný orgán těla [50]. Patogeneze tohoto onemocnění je nejasná, ale obecně se má za to, že jde o důsledek abnormální imunitní odpovědi genetiky predisponovaných jedinců na určité faktory zevního prostředí [51], přičemž podezřelých nox je celá řada, od alergenů až po infekční agens [52]. Patogenetické mechanismy vzniku sarkoidózy se do jisté míry prolínají s mechanismy rozvoje onemocnění covid-19. Zejména jde o společné rysy v ovlivňování systému renin-angiotenzin-aldosteron, společné prvky imunitní odpovědi a ovlivnění drah buněčné smrti [51].

2.2 Kazuistiky

Doposud bylo publikováno několik kazuistik popisujících výskyt sarkoidních granulomů u pacientů různou dobu po infekci SARS-CoV-2. Konkrétně šlo o pět žen, u kterých byly v odstupu jednoho až dvou týdnů zachyceny kožní sarko-

idní granulomy (na pažích, holeních, laterálních stranách stehen, glabelách a submentálně), biopsie byla provedena u třech z nich, s nálezem nekaseifikujících sarkoidních granulomů [51].

Švýcarští autoři publikovali kazuistiku 31letého muže [53], který prodělal covid-19 dvakrát v odstupu 6 měsíců. Po každé byl průběh asymptomatický s výjimkou výsevu svě-

divé růžovočervené makulopapulózní vyrážky na zádech, horních a dolních končetinách. Výsev vyrážky nastal v odstupu několika týdnů od PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) pozitivity SARS-CoV-2. Podruhé byl rozsah výsevu erytematózních papul mnohem větší a svědění horší. Pacient byl tedy komplexně vyšetřen včetně CT hrudníku, které odhalilo mediastinální lymfaden-

Tabulka 4
Přehled publikovaných kazuistik a souborů kazuistik pojednávajících o pneumatokélech jako pozdních komplikací covid-19

Publikace	Pohlaví [m = muž, ž = žena]	Věk [roky]	Kuřáctví	Průběh covid-19*	Farmakoterapie v akutní fázi covid-19	Latence vzniku pneumatokél [dny]
McCann et al. [64]	m	67	ne	O ₂	ATB	9
	m	71	?	IMV	glukokortikoidy, ATB	28
	m	47	?	IMV	ATB	24
Jamal et al. [65]	m	34	ne	O ₂	ATB, glukokortikoidy, favipiravir, nízkomolekulární heparin (LMWH)	43
Sugimoto et al. [66]	m	50	ne	P	LMWH, glukokortikoidy	19
Hamad et al. [67]	m	42	?	P	podpůrná terapie	35
Genzor et al. [60]	m	59	ne	P	ATB, glukokortikoidy	33
Chávez et al. [68]	36 m, 1 ž	41 (± 13)	kuřáci 51 %	IMV 32,4 %		23 (± 11)

* P = pneumonie bez nutnosti oxygenoterapie, O₂ = nutnost oxygenoterapie, IMV = mechanická ventilace; EAP = plicní embolie

nopatii kompatibilní s diagnózou sarkoidózy. Hladina angiotenzin konvertujícího enzymu v séru (SACE) byla zvýšená (145 U/L, norma 20–64 U/L), ostatní laboratorní nálezy byly v normě. Bronchoskopické vyšetření bylo negativní, stejně tak oční vyšetření. Biopsie z kožní léze prokázala přítomnost nekaseifikujících epiteloidních granulomů s diskretní, převážně lymfocytární zánětlivou reakcí. Po zahájení terapie

40 mg prednisolonu denně došlo k rychlému ústupu kožních lézí.

Dále byla popsána kazuistika 35letého thajského muže [54], u kterého se v odstupu 10 týdnů od lehkého průběhu covid-19 rozvinula námahová dušnost, neproduktivní kašel, malátnost, bolest v hrdle a subfebrilie. V post-covid ambulanci bylo na skiagramu hrudníku zjištěno oboustranné zvět-

Tabulka 4
Přehled publikovaných kazuistik a souborů kazuistik pojednávajících o pneumatokélách jako pozdních komplikací covid-19

Klinický projev	Velikost a lokalizace pneumatokél	Komplikace	Terapie komplikace	Další vývoj
dušnost, bolest na hrudi, hemoptýza (současně EAP)	cca 4 × 4 cm v levém dolním, 1 × 1 cm v pravém středním laloku	infekce pravé a posléze i levé pneumatokély	LMWH, neúspěšný pokus o drenáž se vznikem PNO vlevo, 2 běhy antibiotické (ATB) terapie	po 5 měsících zmenšení a po 12 měsících vymizení pneumatokél
dušnost	2 pneumatokély cca 4 × 4 cm v levém středním plicním poli	ne	konzervativní	po 9 měsících parciální regrese
dušnost, bolest na hrudi	cca 5 × 5 cm vpravo, vlevo tenzní PNO	tenzní PNO vlevo + EAP	LMWH, drenáž PNO	po 3 měsících zmenšení pneumatokél, vyplněny tekutinou
dušnost	vícečetné, oboustranné, největší cca 4 × 4 cm s hladinkou	ne	konzervativní	po 3 týdnech subkompletní resorpce nálezu
diskomfort na hrudi, hemoptýza	cca 8 × 4 cm v pravém dolním laloku	ne	konzervativní	?
dušnost, hemoptýza, diskomfort na hrudi	cca 10 × 10 cm v pravém horním laloku, PNO vpravo	PNO vpravo	drenáž PNO, chirurgické ošetření torakoskopicky	propuštěn z nemocnice, další follow-up chybí
bez potíží	vícečetně oboustranné, s maximem v dolních lalocích, některé s hladinkou, největší 32 mm	ne	konzervativní	po 2 měsících parc. regrese, během follow-up další regrese nálezu
	průměrně 6,3 (± 2,8 cm), častěji dolní laloky a subpleurálně	37× pneumo-hematokéla, 30× pneumotorax	26× chirurgické řešení (76 % VATS)	5× úmrtí na komplikace Covid-19, hospitalizace průměrně 20 (± 24) dní

šení plicních hilů. Doplněné CT vyšetření hrudníku objasnilo oboustrannou hilovou, paratracheální a subkarinální lymfadenopatii. Výsledky transbronchiální jehlové aspirace (TBNA) provedené pod endobronchiální ultrazvukovou (EBUS) navigací svědčily o přítomnosti vyvrážděného sarkoidního granulomu. Pomocí PCR byla vyloučena reinfekce SARS-CoV-2. Tuberkulóza a mykotická infekce byly vyloučeny PCR detekcí a kultivací bronchoalveolární lavážní tekutiny a aspirátu uzliny. Hodnota SACE v séru byla při horní hranici normy. Očním vyšetřením byla diagnostikována panuveitida, papilitida a retinální vaskulitida na obou očích. Magnetická rezonance srdce a elektrokardiografie (EKG) nesvědčily pro postižení srdce. Dva měsíce po zahájení léčby 60 mg prednisolonu denně, s detrakcí na 20 mg denně, bylo na kontrolním CT hrudníku patrné zmenšení hilových a mediastinálních lymfatických uzlin, což bylo doprovázeno vymizením horeček, kašle a podstatným zlepšením visu.

Byl publikován též kardiologický soubor čtyř mužských pacientů s granulomatózním postižením srdce po proběhlém lehkém průběhu covid-19 [55]. U jednoho z nich – 35letého muže – byla magnetickou rezonancí a biopticky potvrzena sarkoidóza myokardu s výbornou odpovědí na pulz glukokortikoidů s následnou roční kortikoterapií postupně se snižujícími dávkami prednisolonu. U ostatních tří pacientů biopsie odhalila obrovskobuněčnou myokarditidu, onemocnění s podstatně horší prognózou, přičemž všichni tři přežili díky včasnému zahájení kombinované imunoprese včetně tacrolimu a zajištění implantabilním kardioverterem-defibrilátorem (ICD), a v jednom případě přechodnému napojení na mimotělní podporu oběhu (extracorporeal membrane oxygenation; ECMO).

Byly též zaznamenány případy rozvoje sarkoidózy v časové souvislosti s vakcinací proti SARS-CoV-2. U 61letého Japonce [56] se po aplikaci první dávky vakcíny BNT162b2 během dní rozvinula oční sarkoidóza s pravostanným postižením všech očních segmentů, s následně prokázanou hilovou a mediastinální lymfadenopatií a nekaseifikujícími granulomy zachycenými v histologickém vzorku z transbronchiální biopsie (TBB) a EBUS TBNA. Pacient byl léčen subkapsulární injekcí glukokortikoidu s regresí očních symptomů. Systémové glukokortikoidy nasazeny nebyly. U jiného 44letého muže [57] odhalilo vyšetření pomocí CT a pozitivní emisní tomografie (PET/CT) akumulaci fluorodeoxyglukózy (FDG) v mediastinálních uzlinách nad i pod bránicí. Nález byl zachycen v těsné časové souvislosti po aplikaci třetí dávky vakcíny BNT162b2. V dalších dvou případech (21letá žena a 28letý muž, kavkazská rasa) [58] šlo o rozvoj Löfgrenova syndromu s periartritidou v oblasti kotníku a výsevem kožní vyrážky. V případě muže byla patrná i oboustranná hilová lymfadenopatie. U pacientky došlo ke vzniku příznaků po očkování druhou dávkou vakcíny (1. dávka vakcínou ChAdOx1, 2. dávka vakcínou CX-024414), u pacienta po první dávce vakcíny ChAdOx1. Oba pacienti byli úspěšně léčeni systémovými glukokortikoidy.

Mezi 98 pacienty, kteří prodělali covid-19 infekci a byli z jiných důvodů hospitalizováni mezi 1. 11. 2020 a 31. 5. 2021 na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy Fakultní nemocnice Olomouc, bylo zaznamenáno šest případů nově diagnostikované sarkoidózy. Kauzální souvislost mezi roz-

vjem sarkoidózy a covid-19, či vakcinací proti SARS-CoV-2 však zůstává nadále nejasná [2].

2.3 Shrnutí a komentář

Z doposud publikovaných kazuistik vyplývá možná časová souvislost rozvoje sarkoidózy s obdobím po proděláním covid-19 či po aplikaci vakcíny proti SARS-CoV-2. Hypotéza, že by infekce virem SARS-CoV-2 mohla být spouštěčem onemocnění, se jeví jako pravděpodobná vzhledem k tomu, že obě onemocnění sdílí některé patogenetické mechanismy. Relevantních dat je zatím však k dispozici velmi málo.

3 Pneumatokély

Pneumatokéla je dutinová, vzduchem vyplněná plicní léze [59]. Příčiny vzniku mohou být infekční, ale též neinfekční (inhalační trauma termické či toxické, mechanické trauma, následek invazivní mechanické ventilace i neinvazivní ventilační podpory) [60]. Většinou dochází ke spontánní regresi nekomplikované pneumatokély bez nutnosti specifické terapie [59]. Nejčastější komplikací je vznik pneumotoraxu (PNO) [96,98]. V 90 % dostupných kazuistik týkajících se vzniku spontánního pneumotoraxu při/po covid-19 byla na kontrolním zobrazovacím vyšetření nalezena pneumatokéla [61]. Další možnou komplikací může být sekundární infekce pneumatokély až vznik abscesu či empyému. Vzácněji může dojít ke krvácení do pneumatokély se vznikem pneumo-hematokély, vzácně s rozvojem hemopneumotoraxu, kdy jde častěji o agresivně antikoagulované pacienty na ECMO [59]. V souvislosti s covid-19 pneumonií mohou pneumatokély vznikat jako komplikace jak v akutní [62,63], tak v post-akutní fázi onemocnění.

V zahraniční [64–67] i domácí [60] literatuře byla publikována řada kazuistik popisujících vznik solitárních či vícečetných pneumatokél jako pozdní komplikace covid-19 pneumonie. Výsledky dosud největší kohorty pacientů s pozdním výskytem pneumo-hematokél prezentoval kolektiv Chávez et al. [68], v jejichž souboru 37 pacientů s pneumo-hematokélami jednoznačně dominovali muži ($n = 36$). Ve 32,4 % šlo o pacienty po invazivní mechanické ventilaci, v 51 % o kuřáky. Průměrný odstup od průkazu infekce SARS-CoV-2 do vzniku pneumo-hematokél byl 23 (± 11) dnů. Ve 30 případech došlo ke komplikaci rozvojem pneumotoraxu, přičemž 27 pacientů vyžadovalo posléze chirurgické ošetření, v 76 % cestou videem asistované torakoskopie (VATS). Pět pacientů zemřelo na jiné komplikace související s covid-19, ostatní byli propuštěni průměrně po 20 (± 24) dnech. Shrnutí dostupných kazuistik viz *tab. 4*, přičemž za povšimnutí stojí fakt, že ve všech ostatních publikovaných kazuistikách šlo o pacienty mužského pohlaví.

Závěr

Pandemie covid-19 zůstane zcela jistě po dlouhou dobu celospolečenským problémem. Pacienti zotavení po infekci mohou mít přetrvávající potíže, z kterých většina ustupuje spontánně. Nadále však platí, že pacient s přetrvávající re-

spirační symptomatikou po prodělání onemocnění covid-19 má být odeslán ke komplexnímu plicnímu vyšetření. Potenciálně závažné může být postižení plicního intersticia, které může vést až k rozvoji plicní fibrózy. Zde přes výzkumné pokroky zůstává obvyklou modalitou léčby kortikoterapie. Postižení malých dýchacích cest má nejistý klinický význam a definována není ani jeho správná a efektivní terapie. Méně časté komplikace, jako je vznik sarkoidózy a pneumatokél, jsou předmětem zkoumání.

Literatura

- Kopecký P, Skála M, Neumannová K, Koblížek V. Post-covid syndrom/postižení; definice, diagnostika a klasifikace. Stručný poziční dokument ČPFS ČLS JEP. [Dostupné na www.pneumologie.cz/guidelines/], (online 27. 9. 2022)
- Jakubec P, Fišerová K, Genzor S, Kolář M. Pulmonary Complications after COVID-19. *Life (Basel)*. 2022;12(3):357.
- Oronsky B, Larson C, Hammond TC, et al. A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS). *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021; 20:1–9. doi: 10.1007/s12016-021-08848-3. Epub ahead of print.
- Genzor S, Jakubec P, Sova M, et al. Clinical presentation and pulmonary function tests in post-acute COVID-19 patients. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2022 Sep 6. doi: 10.5507/bp.2022.039. Epub ahead of print.
- Michelen M, Manoharan L, Elkheir N, et al. Characterising long COVID: a living systematic review. *BMJ Glob Health*. 2021;6(9): e005427.
- Zawilska JB, Lagodzinski A, Berezinska M. COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J Physiol Pharmacol*. 2021;72(4). doi: 10.26402/jpp.2021.4.01. Epub 2021 Dec 31.
- Han Q, Zheng B, Daines L, Sheikh A. Long-Term Sequelae of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of One-Year Follow-Up Studies on Post-COVID Symptoms. *Pathogens*. 2022;11(2):269.
- Skala M, Svoboda M, Kopecký M, et al. Heterogeneity of post-COVID impairment: interim analysis of a prospective study from Czechia. *Virology*. 2021;18(1):73.
- Casella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). 2022 Jun 30. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 – [dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>] (online 28. 8. 2022)
- Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8:420–422.
- Kumar N, Gupta A, Vardhan H, Daga MK. Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis: An Update. *Journal of Advanced Research in Medicine*. 2021;8(2):16–26.
- Udwadia ZF, Koul PA, Richeldi L. Post-COVID lung fibrosis: The tsunami that will follow the earthquake. *Lung India*. 2021;38(Supplement):S41–S47.
- Delpino MV, Quarleri J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the rennin-angiotensin system favors lung fibrosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:340.
- Lee JH, Yim JJ, Park J. Pulmonary function and chest computed tomography abnormalities 6–12 months after recovery from COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res*. 2022;23(1):233.
- Cocconcelli E, Bernardinello N, Giraud C, et al. Characteristics and Prognostic Factors of Pulmonary Fibrosis After COVID-19 Pneumonia. *Front Med (Lausanne)*. 2022;8:823600.
- Alarcón-Rodríguez J, Fernández-Velilla M, Ureña-Vacas A, et al. Radiological management and follow-up of post-COVID-19 patients. *Radiologia (Engl Ed)*. 2021;63(3):258–269.
- Lee JH, Yim JJ, Park J. Pulmonary function and chest computed tomography abnormalities 6–12 months after recovery from COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res*. 2022 Sep 6;23(1): 233.
- Huntley CC, Patel K, Bil Bushra SE, et al. Pulmonary function test and computed tomography features during follow-up after SARS, MERS and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *ERJ Open Res*. 2022;8(2):00056–2022.
- Hama Amin BJ, Kakamad FH, Ahmed GS, et al. Post COVID-19 pulmonary fibrosis; a meta-analysis study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2022;77:103590.
- Bernheim A, Mei X, Huang M, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology*. 2020;295(3):200463.
- Sonnweber T, Sahanic S, Pizzini A, et al. Cardiopulmonary recovery after COVID-19: an observational prospective multicentre trial. *Eur Respir J*. 2021;57(4):2003481.
- Thomas M, Price OJ, Hull JH. Pulmonary function and COVID-19. *Curr Opin Physiol*. 2021;21:29–35.
- Zhao Y, Yang C, An X, et al. Follow-up study on COVID-19 survivors one year after discharge from hospital. *Int J Infect Dis*. 2021;112: 173–182.
- Anastasio F, Barbuto S, Scarnecchia E, et al. Medium-term impact of COVID-19 on pulmonary function, functional capacity and quality of life. *Eur Respir J*. 2021;58(3):2004015.
- Lehmann A, Gysan M, Bernitzky D, et al. Comparison of pulmonary function test, diffusion capacity, blood gas analysis and CT scan in patients with and without persistent respiratory symptoms following COVID-19. *BMC Pulm Med*. 2022;22(1):196.
- Thomas M, Price OJ, Hull JH. Pulmonary function and COVID-19. *Curr Opin Physiol*. 2021;21:29–35.
- Myall KJ, Mukherjee B, Castanheira AM, et al. Persistent Post-COVID-19 Interstitial Lung Disease An Observational Study of Corticosteroid Treatment. *Ann Am Thorac Soc* 2021;18(5):799–806.
- Dhooria S, Chaudhary S, Sehgal IS, et al. High-dose versus low-dose prednisolone in symptomatic patients with post-COVID-19 diffuse parenchymal lung abnormalities: an open-label, randomised trial (the COLDSTER trial). *Eur Respir J* 2022;59:2102930.
- Segala FV, Sgalla G, Salvati F, et al. Adjunctive corticosteroid treatment for organizing pneumonia in COVID-19 patients with persistent respiratory failure. *Respir Med* 2021;187:106571.
- Mongardon N, Piagnerelli M, Grimaldi D, et al. Impact of late administration of corticosteroids in COVID-19 ARDS. *Intensive Care Med*. 2021;47:110–112.
- Tlayjeh H, Mhish OH, Enani MA, et al. Association of corticosteroids use and outcomes in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *J Infect Public Health*. 2020;13(11):1652–1663.
- Kim JY, Doo KW, Jang HJ. Acute fibrinous and organizing pneumonia: Imaging features, pathologic correlation, and brief literature review. *Radiol Case Rep*. 2018;13(4):867–870.
- Feinstein MB, DeSouza SA, Moreira AL, et al. A comparison of the pathological, clinical and radiographical, features of cryptogenic organising pneumonia, acute fibrinous and organising pneumonia and granulomatous organising pneumonia. *Journal of Clinical Pathology* 2015; 68:441–447.
- Rosenberg ES, Dufort EM, Udo T, et al. Association of Treatment With Hydroxychloroquine or Azithromycin With In-Hospital Mortality in Patients With COVID-19 in New York State. *JAMA*. 2020;323(24): 2493–2502.
- Cavalcanti AB, Zampieri FG, Rosa RG, et al. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate COVID-19. *N Engl J Med*. 2020;383(21):2041–2052.
- Lee TC, Bortolussi-Courval É, Belga S, et al. Inhaled corticosteroids for outpatients with COVID-19: a meta-analysis. *Eur Respir J*. 2022; 59(5):2102921.
- Ruggiero V, Aquino RP, Del Gaudio P, et al. Post-COVID Syndrome: The Research Progress in the Treatment of Pulmonary sequelae after COVID-19 Infection. *Pharmaceutics*. 2022;14(6):1135.
- Bazdyrev E, Rusina P, Panova M, et al. Lung Fibrosis after COVID-19: Treatment Prospects. *Pharmaceutics (Basel)*. 2021;14(8):807.
- Sundh J, Palm A, Wahlberg J, et al. Impact of COVID-19 on long-term oxygen therapy 2020: A nationwide study in Sweden. *PLoS One*. 2022; 17(4):e0266367.
- Roach A, Chikwe J, Catarino P, et al. Lung Transplantation for COVID-19-Related Respiratory Failure in the United States. *N Engl J Med*. 2022;386(12):1187–1188.

41. Naar J, Krüger A, Vondráková D, et al. 207 Days of Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation Support for Severe COVID-19 Prior to Successful Lung Transplant: A Case Report. Available at SSRN 4078620.
42. Huang R, Zhu J, Zhou J, et al. Inspiratory and Expiratory Chest High-resolution CT: Small-airway Disease Evaluation in Patients with COVID-19. *Curr Med Imaging*. 2021;17(11):1299–1307.
43. Chang YC, Yu CJ, Chang SC, et al. Pulmonary sequelae in convalescent patients after severe acute respiratory syndrome: evaluation with thin-section CT. *Radiology*. 2005;236(3):1067–75.
44. Cho JL, Villacreses R, Nagpal P, et al. Quantitative Chest CT Assessment of Small Airways Disease in Post-Acute SARS-CoV-2 Infection. *Radiology*. 2022;304(1):185–192.
45. Lindahl A, Reijula J, Malmberg LP, et al. Small airway function in Finnish COVID-19 survivors. *Respir Res*. 2021;22(1):237.
46. Lopes AJ, Litrento PF, Provenzano BC, et al. Small airway dysfunction on impulse oscillometry and pathological signs on lung ultrasound are frequent in post-COVID-19 patients with persistent respiratory symptoms. *PLoS One*. 2021;16(11):e0260679.
47. Soummer A, Perbet S, Brisson H, et al. Ultrasound assessment of lung aeration loss during a successful weaning trial predicts postextubation distress. *Crit Care Med*. 2012;40(7):2064–2072.
48. Lopes AJ, Mafort TT, da Costa CH, et al. Comparison Between Lung Ultrasound and Computed Tomographic Findings in Patients With COVID-19 Pneumonia. *J Ultrasound Med*. 2021;40(7):1391–1399.
49. Mogami R, Araújo Filho RC, Cobo Chantong CG, et al. The Importance of Radiological Patterns and Small Airway Disease in Long-Term Follow-Up of Postacute COVID-19: A Preliminary Study. *Radiol Res Pract*. 2022:7919033.
50. Landi C, Bargagli E, Carleo A, et al. A functional proteomics approach to the comprehension of sarcoidosis. *J Proteomics*. 2015;128:375–387.
51. Zhao M, Tian C, Cong S, et al. From COVID-19 to Sarcoidosis: How Similar Are These Two Diseases? *Front Immunol*. 2022;13:877303.
52. Kolek V. Sarkoidóza. In: Kolek V, Kašák V, Vašáková M, et al. *Pneumologie*, 3. vydání. Praha, Maxdorf; 2017; pp 279–290.
53. Rabuffetti A, Borradori L, Heidemeyer K, et al. New onset of sarcoidosis after COVID-19 infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022;10.1111/jdv.18313. doi: 10.1111/jdv.18313.
54. Somboonviboon D, Wattanatham A, Keorochana N, Wongchansom K. Sarcoidosis developing after COVID-19: A case report. *Respirol Case Rep*. 2022;10(9):e01016. doi: 10.1002/rcr2.1016.
55. Bollano E, Polte CL, Mäyränpää MI, et al. Cardiac sarcoidosis and giant cell myocarditis after COVID-19 infection. *ESC Heart Fail*. 2022 Aug 22. doi: 10.1002/ehf2.14088. Epub ahead of print.
56. Numakura T, Murakami K, Tamada T, et al. A Novel Development of Sarcoidosis following COVID-19 Vaccination and a Literature Review. *Intern Med*. 2022 Aug 10. doi: 10.2169/internalmedicine.0104-22. Epub ahead of print.
57. Bauckneht M, Aloè T, Tagliabue E, et al. Beyond COVID-19 vaccination-associated pitfalls on [18F] Fluorodeoxyglucose (FDG) PET: a case of a concomitant sarcoidosis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2021;48(8):2661–2662.
58. Rademacher JG, Tampe B, Korsten P. First Report of Two Cases of Löfgren's Syndrome after SARS-CoV-2 Vaccination-Coincidence or Causality? *Vaccines (Basel)*. 2021;9(11):1313.
59. Jamil A, Kasi A. Pneumatocele. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020. PMID: 32310606.
60. Genzor S, Mizera J, Sova M, et al. Oboustranné vícečetné pneumatocele jako vzácná pozdní komplikace pneumonie covid-19. *Vnitř Lék* 2021;67(8):485–488.
61. Mizera J, Genzor S, Jakubec P. Tenzní pneumotorax jako komplikace covid-19 pneumonie. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*. 2022;19(1):31–38.
62. Sanivarapu RR, Farraj K, Sayedy N, Anjum F. Rapidly developing large pneumatocele and spontaneous pneumothorax in SARS-CoV-2 infection. *Respir Med Case Rep*. 2020;31:101303.
63. Brahmabhatt N, Tamimi O, Ellison H, et al. Pneumatocele and cysts in a patient with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *JTCVS Tech*. 2020;4:353–355.
64. McCann C, Shoeib M, Rashid MI, Kostoulas N. Pneumatocele formation following COVID-19 pneumonia. Is there a role for surgical intervention? *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2021;(4):2184923211059866.
65. Jamal W, Sharif M, Sayeed A, et al. Post-COVID-19 pneumonia pneumatoceles: a case report. *Eur Clin Respir J*. 2022;9(1):2028423.
66. Sugimoto H, Era Y, Sugimoto K. Pneumatocele after recovering from COVID-19. *BMJ Case Rep*. 2022;14(4):e242729.
67. Hamad AM, El-Saka HA. Post COVID-19 large pneumatocele: clinical and pathological perspectives. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2021;33(2):322–324.
68. Chávez KV, Pimienta-Ibarra AS, Márquez-González H, et al. Post COVID-19 pneumo-hematocele: clinical presentation and treatment pathway. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2022;70(6):566–574.