

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína (Preventivní medicína)



MUDr. Klára Labská

Role metody PCR v diagnostice neuroinfekcí vyvolaných herpetickými viry

*Diagnosics of neuroinfection caused by human herpesviruses using nucleic acid
amplification methods*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

Konzultant: RNDr. Kateřina Roubalová, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 7.9.2020

Klára LABSKÁ

Podpis

Identifikační záznam:

LABSKÁ, Klára. *Role metody PCR v diagnostice neuroinfekcí vyvolaných herpetickými viry. [Diagnostics of neuroinfection caused by human herpesviruses using nucleic acid amplification methods]*. Praha, 2020. 77 s, Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika infekčních nemocí 2. LF UK a Nemocnice Na Bulovce. Vedoucí práce: Vilma Marešová

Souhrn

Diagnostika neuroinfekcí prodělává v posledních letech příklon k molekulárně biologickým metodám. Náš výzkum se soustředil na význam přítomnosti DNA neurotropních herpetických virů (HSV1, HSV2, VZV a HHV6) v mozkomíšním moku. V první studii jsme sledovali přítomnost DNA neurotropních herpetických virů (HV) v mozkomíšním moku u imunokompetentních pacientů s laboratorně potvrzenou klíšťovou meningoencefalitidou a enterovirovou meningitidou a meningoencefalitidou. Kontrolní skupinu tvořili pacienti shodné věkové struktury bez prokázaného zánětu v mozkomíšním moku. Pacienti byli sledováni po dobu 6 měsíců. Průběh onemocnění a jeho následky včetně laboratorních vyšetření byly porovnány mezi skupinami pacientů s prokázanou a bez prokázané HV DNA. V druhé studii jsme prokazovali přítomnost HSV1 DNA v mozkomíšním moku u pacientů s purulentní meningitidou, u kterých byl průběh onemocnění komplikován výsevem herpes labialis.

V našem souboru imunokompetentních pacientů s nehnisavým zánětem v mozkomíšním moku jsme detekovali HV DNA virů u 13 ze 173 pacientů (7,5 %), zachytili jsme i DNA dvou herpetických virů současně. Podíl pacientů se zánětem CNS vyvolaným klíšťovou meningoencefalitidou a detekovanou HV DNA tvořil 7,3 % (7 z 96) a nejčastěji byl detekován virus VZV. V souboru pacientů s enterovirovou meningitidou a meningoencefalitidou byl podíl pacientů s HV DNA 7,8 % (6 ze 77) a nejčastěji byla detekován virus HHV6. Záchyt HV DNA nebyl asociován se závažným klinickým průběhem onemocnění. Příčinou přítomnosti HV DNA je nejspíše reaktivace HV při zánětech, což potvrzuje minimální záchyt HV DNA u pacientů bez zánětlivého cytologického nálezu v mozkomíšním moku. HSV1 DNA v mozkomíšním moku při periferní reaktivaci jsme detekovali pouze u jedné pacientky s významným imunodeficitem.

Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin jsou v současnosti hlavním diagnostickým vodítkem, proto mohou nálezy DNA neurotropních herpetických virů v mozkomíšním moku činit diagnostické obtíže. Výsledek těchto vyšetření je vždy interpretovat s ohledem na klinický stav pacienta, anamnézu a výsledky dalších vyšetření.

Klíčová slova: mozkomíšní mok; metody amplifikace virových nukleových kyselin; Herpes simplex virus typ 1, Herpes simplex virus typ 2; Varicella zoster virus; Lidský herpetický virus 6 typ A; Lidský herpetický virus 6 typ B; enterovirová meningoencefalitida; klíšťová meningoencefalitida

Summary

In recent years, the diagnosis of neuroinfections has undergone a shift towards molecular biology methods. Our research focused on the predictive value of the capture of herpesvirus (HV) DNA in cerebrospinal fluid. In the first study, we examined the presence of DNA neurotropic herpes viruses (HSV1, HSV2, VZV and HHV6) in cerebrospinal fluid in immunocompetent patients with laboratory-confirmed tick-borne meningoencephalitis and enterovirus meningitis and meningoencephalitis. The control group consisted of patients with proven absence of an inflammation in the cerebrospinal fluid. Patients were followed for 6 months. The course of the disease and its consequences, including laboratory tests, were compared between groups of patients with and without the presence of HV DNA. In the second study, we tried to demonstrate the presence of HSV1 DNA in cerebrospinal fluid during its symptomatic reactivation in patients with purulent meningitis. In our group of immunocompetent patients with non-purulent inflammation in the cerebrospinal fluid, the proportion of HV DNA positive patients reached 7.5% (13 out of 173), we also captured the DNA of two herpes viruses simultaneously. The proportion of patients with CNS inflammation caused by tick-borne meningoencephalitis with detected DNA from neurotropic herpes viruses was 7.3 % (7 out of 96), with VZV DNA being the most abundant. In the group of patients with enterovirus meningitis and meningoencephalitis, the proportion of patients with HV DNA was 7.8% (6 out of 77) with HHV6 DNA being the most frequent. HV DNA positivity was not associated with severe course of the disease. The reason for HV DNA positivity is probably HV reactivation under inflammatory conditions, which is supported by the minimal capture of HV DNA in patients without inflammatory cytological findings in cerebrospinal fluid. We detected HSV1 DNA in cerebrospinal fluid during its peripheral reactivation in only one patient with significant immunodeficiency. Since nucleic acid amplification-based methods are currently the main diagnostic tool, the detection of the DNA of neurotropic herpes viruses in cerebrospinal fluid can cause diagnostic difficulties. The result of these examinations should always be interpreted in comprehensive manner with regard to the patient's clinical condition, history and the results of other examinations.

Keywords: cerebrospinal fluid; nucleic acid amplification tests; Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2; Varicella-zoster virus; Human betaherpesvirus 6A; Human betaherpesvirus 6B; enteroviral meningoencephalitis; tick-borne encephalitis

Poděkování

Děkuji kolektivu Národní referenční laboratoře pro herpetické viry (Státní zdravotní ústav, Praha) za poskytnutí pozitivních kontrol a metodickou podporu. Děkuji biostatistikovi Ing. Procházkovi (Státní zdravotní ústav, Praha) za statistické vyhodnocení souboru. Děkuji kolektivu lékařů Infekční kliniky Fakultní nemocnice Na Bulovce za trpělivost a spolupráci.

Obsah

Souhrn	4
Summary	5
Poděkování.....	6
Obsah	7
Seznam grafů.....	9
Seznam obrázků	10
Seznam tabulek	10
Seznam použitých zkratk.....	11
1 Literární úvod a přehled problematiky	13
1.1 Lidské herpetické viry – taxonomie.....	13
1.2 Životní cyklus herpetických virů na buněčné úrovni.....	15
1.3 Lidské herpetické viry epidemiologie	17
1.3.1 Herpes simplex virus typ 1 (HSV1).....	17
1.3.2 Herpes simplex virus typ 2 (HSV2).....	17
1.3.3 Lidský cytomegalovirus (CMV).....	19
1.3.4 Varicella zoster virus (VZV)	19
1.3.5 Lidský herpetický virus 6 typ A, lidský herpetický virus 6 typ B a lidský herpetický virus 7 (HHV6A, HHV6B a HHV7)	22
1.3.6 Virus Epsteinina – Barrové (EBV)	22
1.3.7 Lidský herpetický virus (HHV8)	23
1.4 Životní cyklus herpetických virů v makroorganismu	24
1.4.1 HSV1 a HSV2.....	24
1.4.2 VZV	25
1.4.3 Cytomegalovirus.....	25

1.4.4	HHV6 typ A, HHV6 typ B	26
1.4.5	HHV7	26
1.4.6	EBV	26
1.4.7	HHV 8	26
1.5	Herpetické viry z pohledu veřejného zdraví	27
1.6	Vztah lidských herpetických viru k neuroinfekcím	28
1.6.1	Neurotropní lidské herpetické viry: HSV, VZV, HHV6	28
1.7	Diagnostika virových zánětů CNS	30
1.7.1	Mozkomíšni mok, vznik, funkce, složení, odběr	31
1.7.2	Vyšetření mozkomíšního moku	32
1.8	Virologické vyšetření mozkomíšního moku	34
1.8.1	Metody nepřímé – průkaz intrathékální syntézy protilátek	34
1.8.2	Metody přímé	36
1.9	Terapie a profylaxe infekcí vyvolaných herpetickými viry	41
1.9.1	Antivirotika	41
1.9.2	Vakcíny	44
2	Cíle a hypotézy	46
2.1	Studie č. 1 Přítomnost DNA neurotropních herpetických virů u pacientů s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie	46
2.2	Studie č. 2 Výskyt HSV 1 DNA v mozkomíšním moku u pacientů s výsevem herpes labialis	47
3	Materiál a metodika Studie č. 1	47
3.1.1	Pacienti	47
3.1.2	Sledované parametry	48
3.1.3	Laboratorní metody	49
3.1.4	Statistické vyhodnocení	51

4	Výsledky Studie č. 1	51
5	Materiál a metodika Studie č. 2 – Výskyt HSV DNA v mozkomíšním moku u pacientů výsevem herpes labialis	57
6	Výsledky Studie č.2.....	58
	6.1.1 Kasuistika.....	58
7	Diskuze	60
8	Závěr.....	62
9	Literatura	63

Seznam grafů

Graf 1: Séropozitivita anti HSV1 IgG dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno z (PebodyR. et al., 2004).....	18
Graf 2: Séropozitivita HSV2 dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika viz (Pebody R. et al., 2004).....	18
Graf 3: Séropozitivita CMV dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno (Roubalová K., Seeman J., 1998).....	19
Graf 4: Séropozitivita VZV dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno (Roubalová K., Seeman J., 1998).....	20
Graf 5: Hlášené uzavřené případy MKN-10 B01.x dle věkových skupin na 100 000 obyvatel; 2015-2019, EpiDat, Česká republika. Vztaženo na střední stav obyvatelstva v daném roce.	21
Graf 6: Hlášené uzavřené případy herpes zoster (B02) dle věkových skupin na 100 000 obyvatel; 2015-2017, EpiDat, Česká republika, vztaženo na střední stav obyvatelstva v daném roce.....	21
Graf 7: Séropozitivita anti EBNA1 IgG dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno z (Roubalová K., Seeman J., 1998).....	22
Graf 8: počet hlášených uzavřených případů syndromu infekční mononukleózy (B27.x) po vyloučení případů vyvolaných CMV (B27.1) na 100 000 obyvatel v rámci věkové skupiny, Česká republika, 2018-2019, ISIN; vztaženo na střední stav obyvatelstva.....	23

Graf 9: Séropozitivita anti HHV8 IgG (lytický antigen) dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno ze (Suchánková A. et al., 2003)	24
--	----

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura virionu Herpesvirales.	14
Obrázek 2: Fylogenetická příbuznost herpetických virů.	15
Obrázek 3: Životní cyklus herpetických virů.....	16
Obrázek 4: Diagram poměru kvantity IgG protilátek v mozkomíšním moku a periferní krvi (séru) za různého stavu hematoencefalické bariéry dle Reibera.	35
Obrázek 5: Real-time PCR (Polymerázová řetězová reakce v reálném čase).	37

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled antivirotik užívaných v terapii infekcí vyvolaných herpetickými viry	42
Tabulka 2: Dávkování antivirotik v terapii neuroinfekcí vyvolaných herpetickými viry	43
Tabulka 3: Preventivní a profylaktické vakcíny ve fázi preklinických a klinických testů dle (Xu X., 2019)	45
Tabulka 4: Popis složení reakční směsi a reakčních podmínek.....	50
Tabulka 5: Věk a pohlaví pacientů ve skupinách s nehnisavým zánětem CNS a kontrolní skupině	52
Tabulka 6: Klinické formy onemocnění u pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie a paralelním záchytem DNA herpetických virů v mozkomíšním moku	53
Tabulka 7: Porovnání klinického průběhu laboratorního nálezu u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku, výsledky statistického vyhodnocení kardinálních atributů	54
Tabulka 8: Porovnání klinického průběhu a terapie za hospitalizace a při propuštění u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku	55

Tabulka 9: Porovnání klinického průběhu při kontrolách po propuštění (1.,3. a 6.měsíc) u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku..... 56

Tabulka 10: Základní demografická data pacientů s purulentní meningitidou a výsevem herpes labialis, u kterých byl opakovaně vyšetřován mozkomíšní mok při kontrolních lumbálních punkcích 57

Seznam použitých zkratk

ALT	-	alaninaminotransferáza
AST	-	aspartátaminotransferáza
ATB	-	antibiotika
CD	-	cluster of differentiation
CE-IVD	-	"Conformité Européenne" in vitro diagnostics
CMV	-	cytomegalovirus, též uváděn jako HHV5
CNS	-	centrální nervová soustava
ČR	-	Česká republika
CT	-	výpočetní tomografie
DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
EBV	-	virus Epsteinova – Baarova, též uváděn jako HHV4
EEG	-	elektroencefalografie
HHV6	-	lidský herpetický virus 6 (bez rozlišení typu)
HHV6A	-	lidský herpetický virus 6 typ A
HHV6B	-	lidský herpetický virus 6 typ B
HHV7	-	lidský herpetický virus 7
HHV8	-	lidský herpetický virus 8, též uváděn jako KSHV
HIV	-	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HSV1	-	herpes simplex virus typ 1
HSV2	-	herpes simplex virus typ 2
Ig	-	imunoglobulin

JIP	-	jednotka intenzivní péče
KD	-	kostní dřev
MM	-	mozkomíšní mok
MRZH	-	measles, rubella, zoster, herpes
MSM	-	muži mající sex s muži
NAAT	-	nucleic acid amplification test
RTG	-	skiagrafické vyšetření
SPC	-	Souhrn údajů o přípravku
UK	-	Spojené království Velké Británie a Severního Irska
USA	-	Spojené státy americké
VZV	-	varicella zoster virus, též uváděn jako HHV3

1 Literární úvod a přehled problematiky

Na přelomu tisíciletí došlo k revoluci ve virologické diagnostice. Do rutinního používání byly postupně zavedeny metodiky amplifikace virových nukleových kyselin (NAAT) a marginalizovaly kultivační metody, které byly do té doby považovány za zlatý standard. NAAT výrazně zrychlily diagnostiku, ukázaly se jako senzitivní i specifické jak pro diagnostiku, tak i monitoring léčby řady virových onemocnění. Rozmach těchto metod přinesl také řadu specifických problémů, z nichž řada není uspokojivě vyřešená dodnes. Sem patří jednak metodické problémy typu správné laboratorní praxe, citlivosti metod, kvantifikace a její standardizace, dále pak interpretační problémy, zejména u agens perzistujících v lidském organismu. Herpetické viry patří mezi známé vyvolavatele lidských život ohrožujících neuroinfekcí, dlouhodobě perzistují v organismu v latentním stavu, ze kterého se umí reaktivovat.

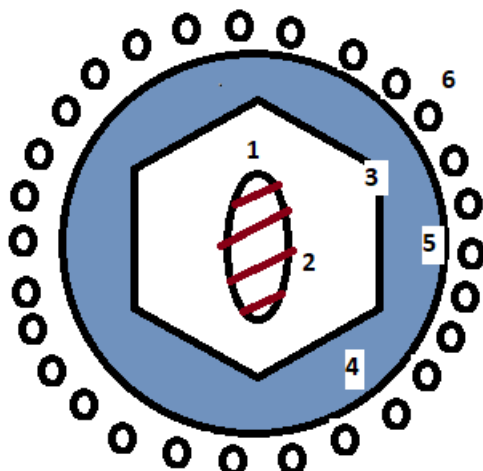
Ve své práci jsem se zaměřila na interpretaci záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku při abnormálním biochemickém a cytologickém nálezu interpretovaném jako neuroinfekce.

V práci je diskutován klasický postup diagnostiky nehnisavých zánětů centrální nervové soustavy (CNS) se zřetelem na likvorologickou diagnostiku, životní cyklus herpetických virů s ohledem na možnosti jejich záchytu v různých biologických materiálech a metodické přístupy k diagnostice infekcí vyvolaných herpetickými viry.

1.1 Lidské herpetické viry – taxonomie

Herpetické viry (Herpesvirales) jsou velmi starý řád. Jejich evoluce spadá do doby cca před 400 miliony let, kdy se pravděpodobně vyvinuly z DNA fágů. Jednotlivé druhy jsou vždy úzce specializované na hostitele, což často ztěžuje jejich výzkum absencí vhodného modelového organismu.

Herpetické viry patří k významným lidským i zvířecím patogenům. Strukturně jsou lidské herpetické viry obalené viry s kapsidou ikosahedrické symetrie obsahující lineární dvouvláknovou DNA (struktura virionu viz *Obrázek 1*). Taxonomicky patří spolu s herpetickými viry ryb a obojživelníků (Alloherpesviridae) a herpetickými viry měkkýšů (Malacoherpesviridae) do řádu Herpesvirales.



Obrázek 1: Struktura virionu Herpesvirales.

1 – nukleoprotein; 2 – dvouvláknová (ds DNA); 3 – kapsida ikosahedrické souměrnosti (dvacetistěn); 4 – tegument; 5 – fosfolipidová membrána; 6 – povrchové glykoproteiny

Dle International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV 2019) klasifikace obsahuje čeleď Herpesviridae: 3 podčeledi, 13 rodů a 107 druhů virů, z nichž je pouze 8 primárními lidskými patogeny.

Lidské herpetické viry byly historicky rozděleny do 3 podčeledí na základě biologických vlastností, platnost tohoto rozdělení byla potvrzena i metodami komparativní genomiky; viz *Obrázek 2*.

Podčeleď Alphaherpesvirinae

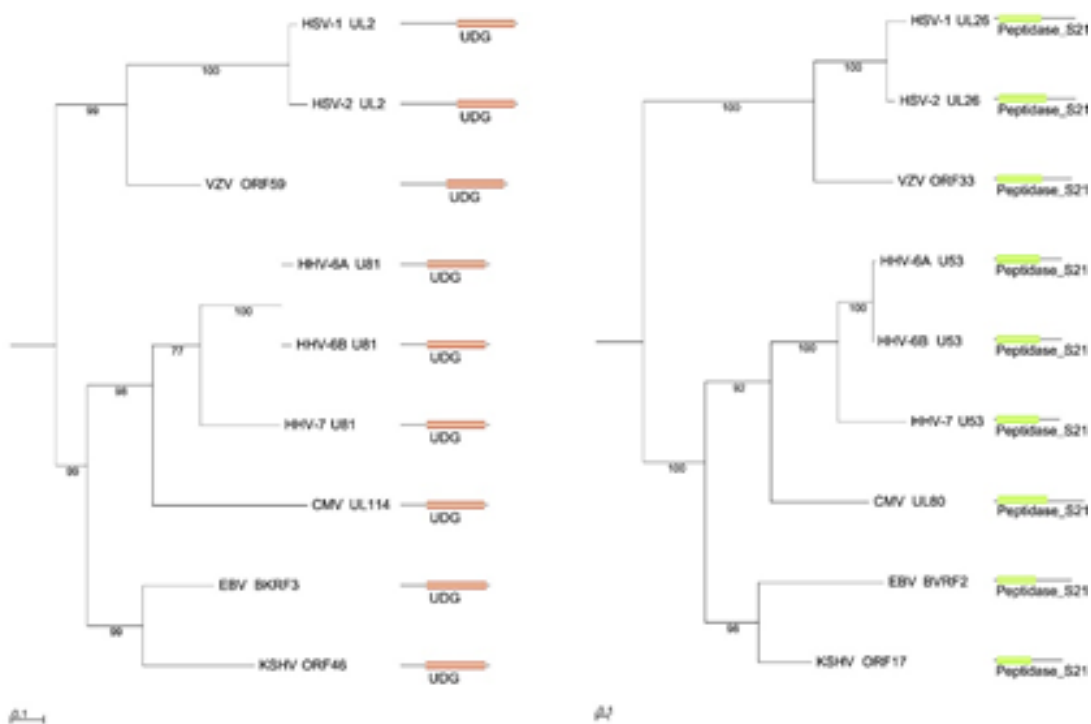
Alphaherpesvirinae mají krátký replikační cyklus, rychle se šíří v tkáňové kultuře, mají širší spektrum hostitelských organismů u rodu Simplex virus. Hlavní místem latence jsou ganglia senzitivních nervů. Podčeleď obsahuje rody Simplex virus (druhy: herpes simplex typ 1, herpes simplex typ 2) a Varicellovirus (druh: varicella zoster).

Podčeleď Betaherpesvirinae

Betaherpesvirinae mají dlouhý replikační cyklus, pomalé šíření v tkáňové kultuře a úzké spektrum hostitelů. Podčeleď obsahuje rody Cytomegalovirus (druh: lidský cytomegalovirus) a Roseolovirus (druhy: lidský herpetický virus 6 typ A, lidský herpetický virus 6 typ B a lidský herpetický virus 7).

Podčeď Gammaherpesvirinae

Gammaherpesvirinae jsou úzce druhově specializované, in vitro kultivace je možná hlavně na lymfoblastoidních liniích, hlavní místem latence jsou lymfoidní buňky, viry této podčeďi mají transformační potenciál. Podčeď obsahuje rody Lymfocryptovirus (druh: virus Epstein-Baarové) a Rhadinovirus (druh: lidský herpetický virus 8).



Obrázek 2: Fylogenetická příbuznost herpetických virů.

Současný pohled na genetickou příbuznost lidských herpetických virů dle sekvenční analýzy (maximum likelihood algoritmus) genů uracylglykosilázy (UDG) a peptidázy S21, délka větví je proporční k očekávanému počtu mutací na místo a hodnoty podporu větví bootstrap analýzou (převzato z: Zmasek C. et al., 2019)

1.2 Životní cyklus herpetických virů na buněčné úrovni

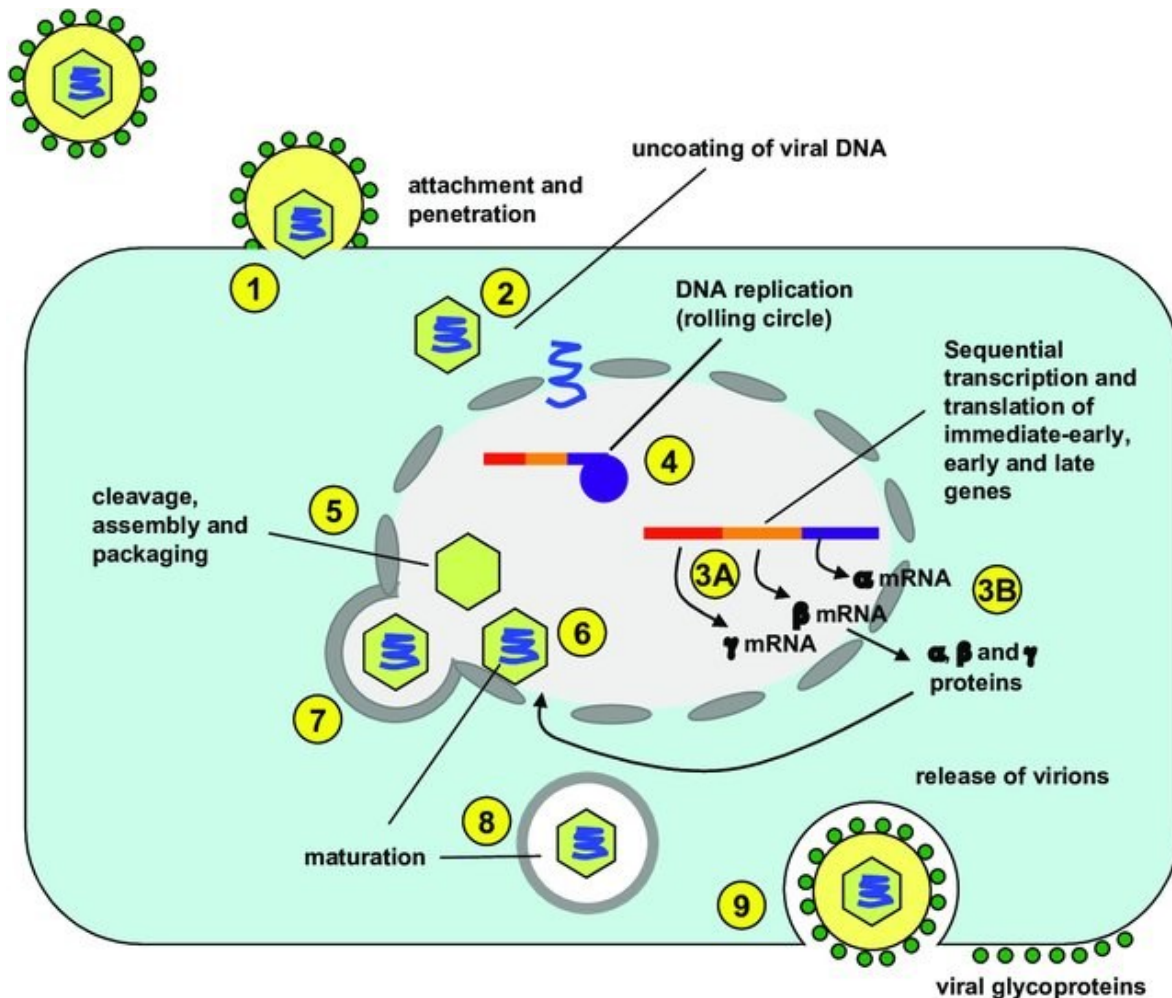
Herpetické viry sdílí podobný životní cyklus viz *Obrázek 3*, jednotlivé druhy se liší zejména receptory pro vstup do buňky. Po interakci povrchový glykoprotein viru – receptor dochází ke splynutí buněčných membrán mechanismem endocytózy, uvolnění nukleokapsidy, která putuje do jádra. V buněčném jádře se virová DNA transkribuje a následně replikuje. Z hlediska replikace se virové geny dělí do 3 skupin, které se kaskádovitě vzájemně aktivují:

1. bezprostředně časné (immediate early) geny – transkribují se první a jejich produkty mají regulační úlohu v rámci latence nebo započetí lytického cyklu.

2. časné (early) geny – k jejich aktivaci je třeba produktů bezprostředně časných genů, podílejí se na replikaci virové DNA.

3. pozdní (late) geny – kódují strukturální proteiny.

Virová DNA se replikuje cirkulárním mechanismem, kdy vzniká vlákno obsahující mnoho kopií virového genomu a musí být rozštěpeno při vkládání virové DNA do kapsidy terminázovým komplexem. Nukleokapsida vzniká v jádře, fosfolipidovou membránu získává pučením z jaderné membrány a exocytózou je zralá virová partikule transportována z buňky viz *Obrázek 3*.



Obrázek 3: Životní cyklus herpetických virů

Převzato z: (Zimmerli, n.d.)

1.3 Lidské herpetické viry epidemiologie

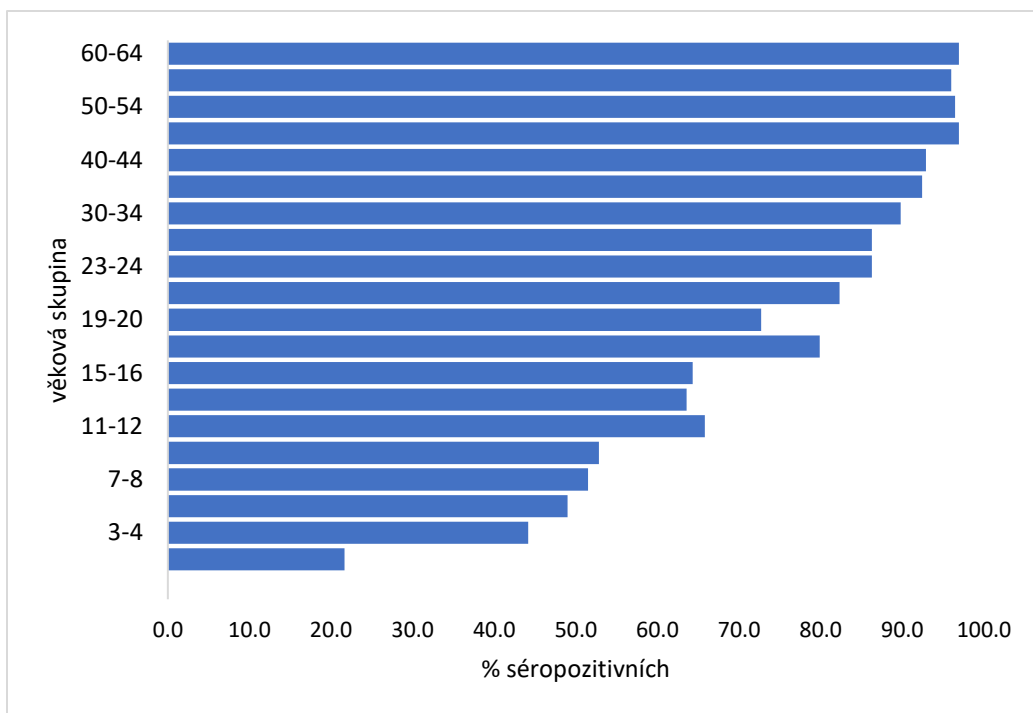
1.3.1 Herpes simplex virus typ 1 (HSV1)

Séroprevalence se liší v rozvinutých a rozvojových zemích (James et al., 2020). V rozvojových zemích stále platí, že k primoinfekci dochází nejčastěji v dětství, do 10ti let věku séroprevalence dosahuje více než 90 % populace. Globálním měřítku dochází k postupnému poklesu séroprevalence na 67 % u dospělých pod 50 let věku (James et al., 2020). V rozvinutých zemích je tento trend ještě výraznější USA, v roce 2015 již pouze 47,8 % séropozitivních v kohortě pod 50 let (Schulte et al., 2014). Studie primárně určená ke sledování efektivity vakcíny Herpevac GSK, která probíhala v letech 2002-2010, ukázala, že v USA bylo 31 % žen ve věkové skupině 18-30 let HSV1 i HSV2 séronegativních (Schulte et al., 2014).

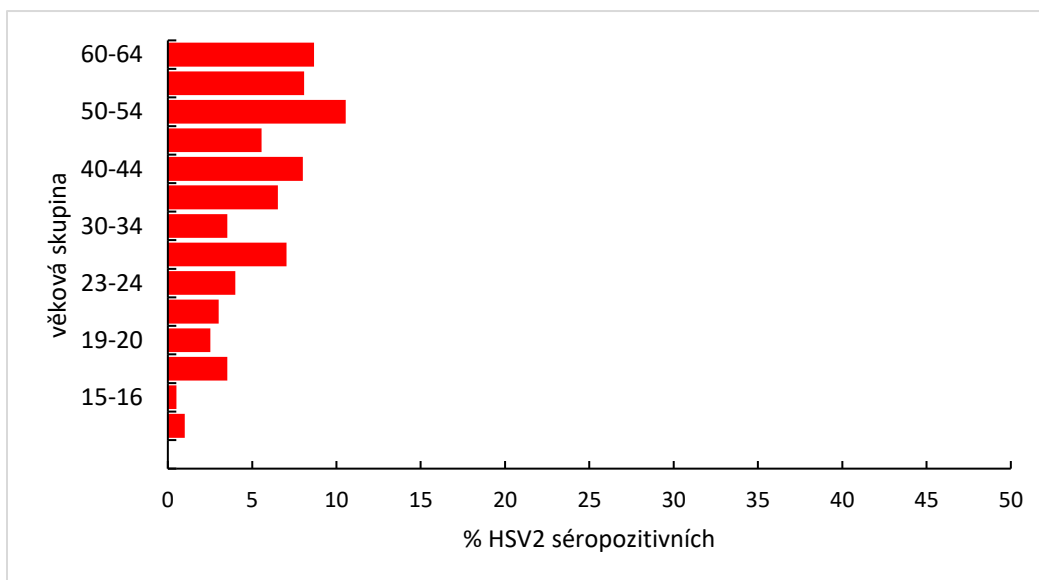
Poslední česká data pochází ze sérologického přehledu realizovaného v roce 1996, kdy bylo v populaci dosaženo 90 % promořenosti ve věkové skupině 30+ viz *Graf 1* – modifikováno z (Roubalová K., Seeman J., 1998; Pebody R. et al., 2004). Odlišný věk primoinfekce vede k změně mechanismu přenosu (původně slinami a vstupu přes sliznici oropharyngu) a HSV1 se stává významným původcem herpes genitalis. Tento trend pozorovali např. ve Finsku, kde ve stěrech z herpes genitalis u žen do 25 let v letech 1991-1995 převažoval HSV2, zatímco v letech 2004-2010 již převažoval HSV1 (Tuokko H. et al., 2014).

1.3.2 Herpes simplex virus typ 2 (HSV2)

HSV2 je nejčastějším vyvolavatelem pohlavně přenosné nemoci ve světovém měřítku, 5 % světové populace ročně prodělá aktivní vřed na genitálu vyvolaný HSV (James Ch. et al., 2020). Celosvětová HSV2 séroprevalence dosahuje 13,2 %, u žen je dvojnásobná proti mužům (17,1 % vs 9,3 %). Séroprevalence je nejvyšší v africkém regionu – 43.9 %, v evropském regionu dosahuje 10.7 %. Poslední česká data pocházejí ze sérologických přehledů v letech 1996 (6 % viz (Pebody R. et al., 2004), na českých datech nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi muži a ženami, podíl séropozitivních dle věkových skupin je uveden v *Graf 2*.



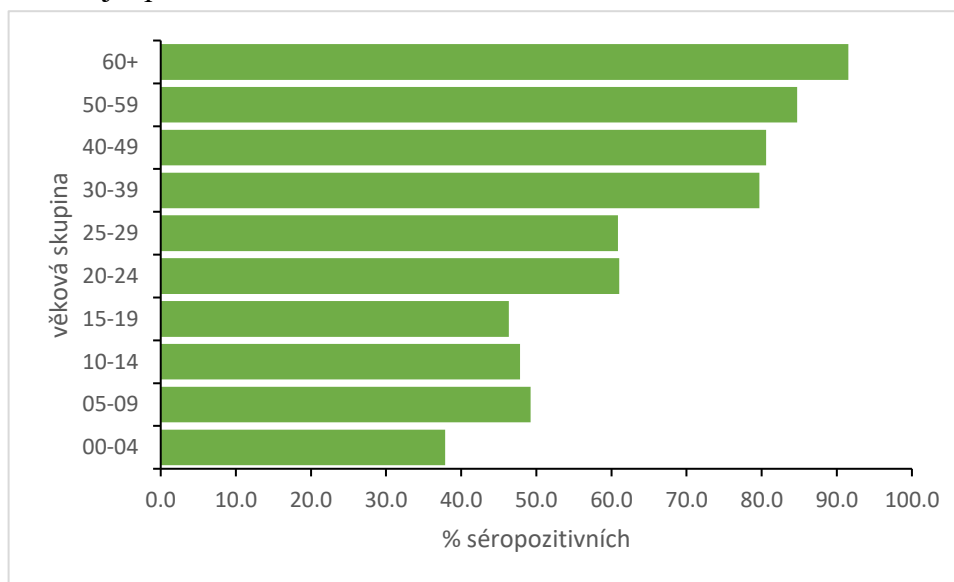
Graf 1: Séropozitivita anti HSV1 IgG dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno z (PebodyR. et al., 2004)



Graf 2: Séropozitivita HSV2 dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika viz (Pebody R. et al., 2004)

1.3.3 Lidský cytomegalovirus (CMV)

Cytomegalovirus je významným oportunním patogenem u imunokompromitovaných a nejčastějším virovým vyvolavatelem kongenitální infekce s 0,6 % prevalencí u novorozenců v rozvinutých zemích světa a je nejčastějším původcem hluchoty, až 12 % sensorineurálních sluchových deficitů a 8 % mozkové obrny u dětí je na podkladě kongenitální CMV infekce (Navti O. et al, 2016). Celosvětová séroprevalence je 83 %, v evropském regionu je nižší 66 % (Zuhair M. et al., 2019). Poslední česká data pochází ze sérologických přehledů z roku 1996, celková séroprevalence v české populaci dosahovala 63,5 % bez rozdílu mezi pohlavími (Roubalová K., Seeman J., 1998), séroprevalence v jednotlivých věkových skupinách viz *Graf 3*. Také u cytomegaloviru dochází v rozvinutých zemích k posunu věku primoinfekce z dětství do dospělosti viz Německo (Voigt S. et al., 2016), kde v letech 2003-2006 séroprevalence ve věkové skupině 14-17 let dosahovala již pouze 32 %.

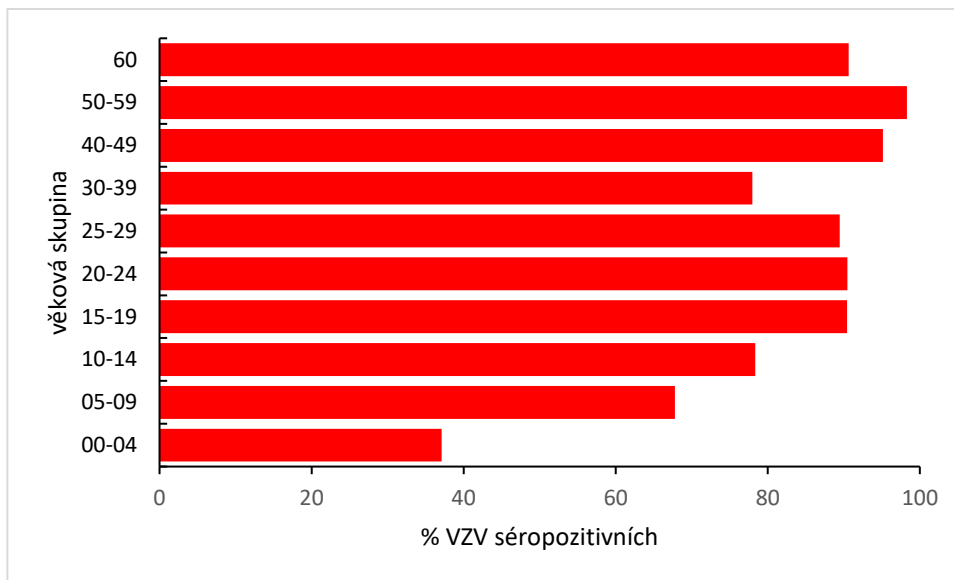


Graf 3: Séropozitivita CMV dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno (Roubalová K., Seeman J., 1998)

1.3.4 Varicella zoster virus (VZV)

VZV je původcem preventabilních onemocnění provázejících jak primoinfekci (varicella) tak reaktivaci (herpes zoster) tohoto viru. Epidemiologie VZV je odlišná v různých klimatických pásmech (Gershon A. et al., 2015), v evropském regionu dosahuje séroprevalence v neočkované

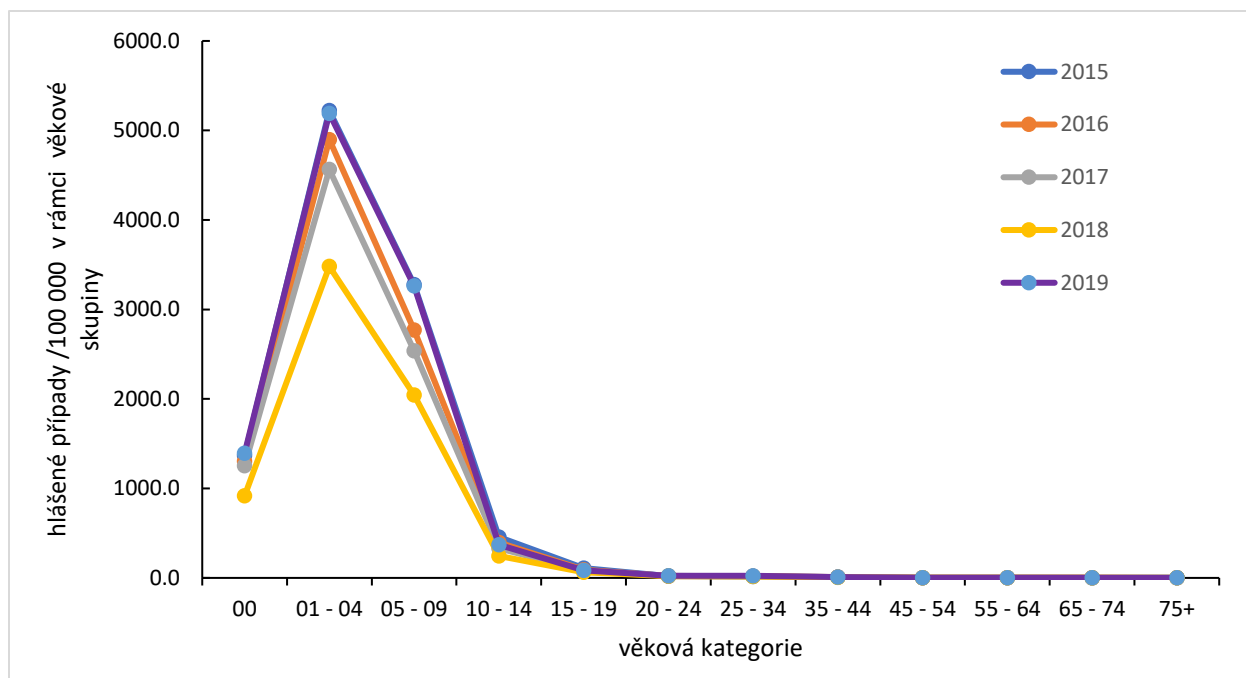
populaci více než 90 % již před 15 rokem života (Bollaerts K. et al., 2017). Poslední česká data pochází ze sérologických přehledů z roku 1996, séroprevalence v české populaci dosahovala více než 90 % již ve věkové skupině 15 až 19 let bez rozdílu mezi pohlavími (Roubalová K., Seeman J., 1998) viz Graf 4.



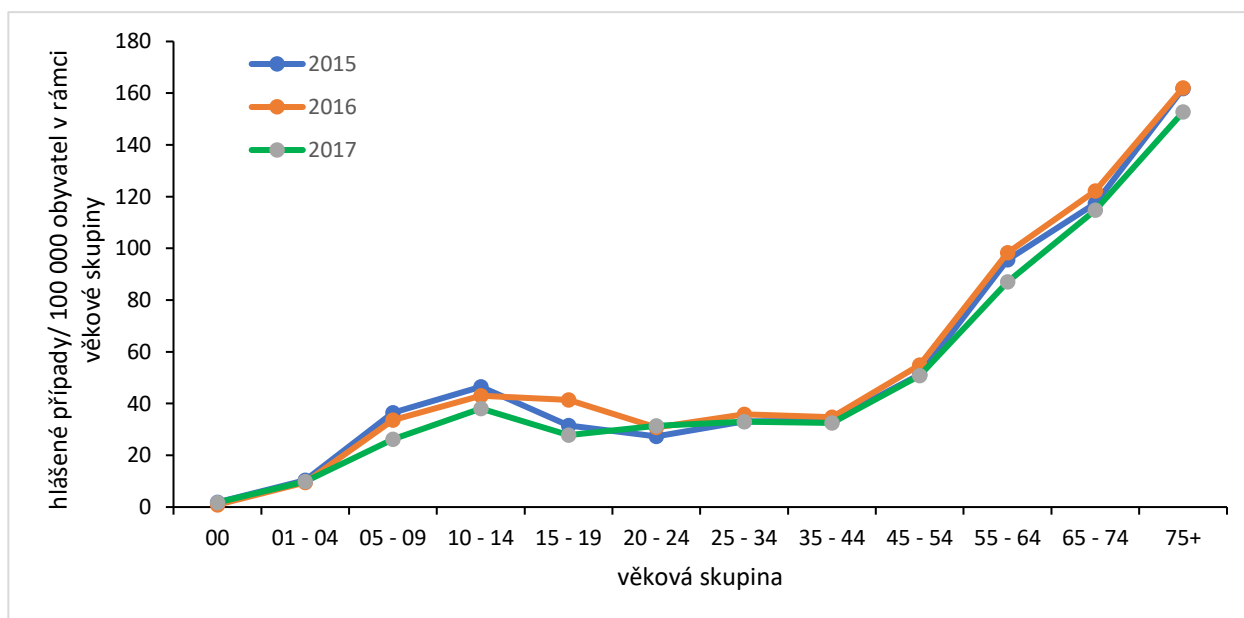
Graf 4: Séropozitivita VZV dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno (Roubalová K., Seeman J., 1998)

Hlavní mechanismus přenosu infekční aerosol při akutním onemocněním varicellou, méně často přímý kontakt – infekční virus ve vezikulární tekutině (varicella i herpes zoster). Varicella je vysoce nakažlivá – reprodukční číslo (R_0) 12-18. K primoinfekci dochází nejčastěji v dětství v souvislosti s pobytem v předškolních zařízeních a školní docházkou viz *Graf 5*.

Symptomatická reaktivace VZV proběhne asi u 1/3 až 1/2 populace starší 50ti let (Hope-Simpson R., 1965; Oxman M., 2010), což je patrné i z počtu hlášených případů dle věkových skupin v České republice (ČR) viz *Graf 6*. Recidivy herpes zoster jsou vzácné – do 1 % u imunokompetentních jedinců (Donahue J. et al., 1995). Dochází i k symptomatickým reinfekcím – tzv. sekundární varicelle, zejména u těch, co prodělali primoinfekci do 2 let věku.



Graf 5: Hlášené uzavřené případy MKN-10 B01.x dle věkových skupin na 100 000 obyvatel; 2015-2019, EpiDat, Česká republika. Vztaheno na střední stav obyvatelstva v daném roce.



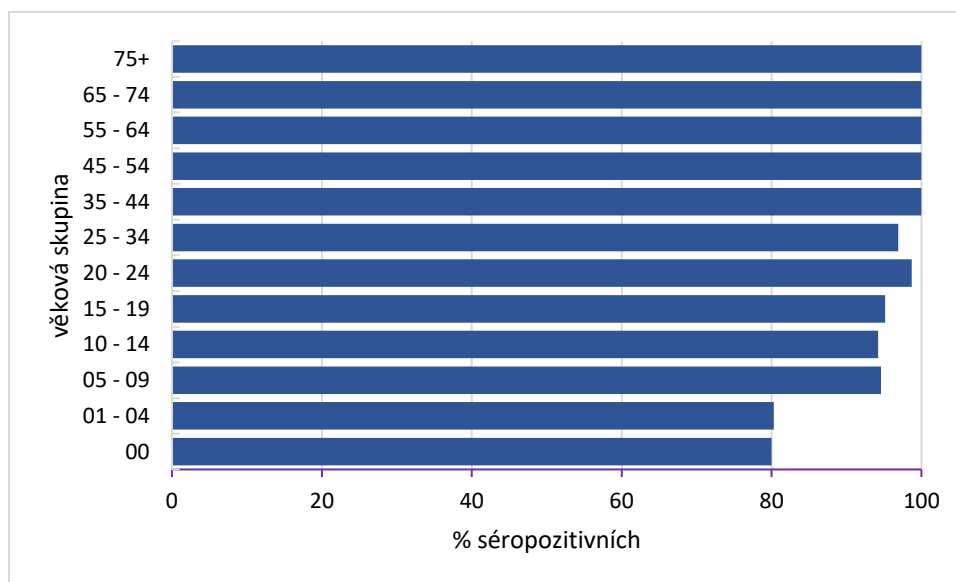
Graf 6: Hlášené uzavřené případy herpes zoster (B02) dle věkových skupin na 100 000 obyvatel; 2015-2017, EpiDat, Česká republika, vztaheno na střední stav obyvatelstva v daném roce

1.3.5 Lidský herpetický virus 6 typ A, lidský herpetický virus 6 typ B a lidský herpetický virus 7 (HHV6A, HHV6B a HHV7)

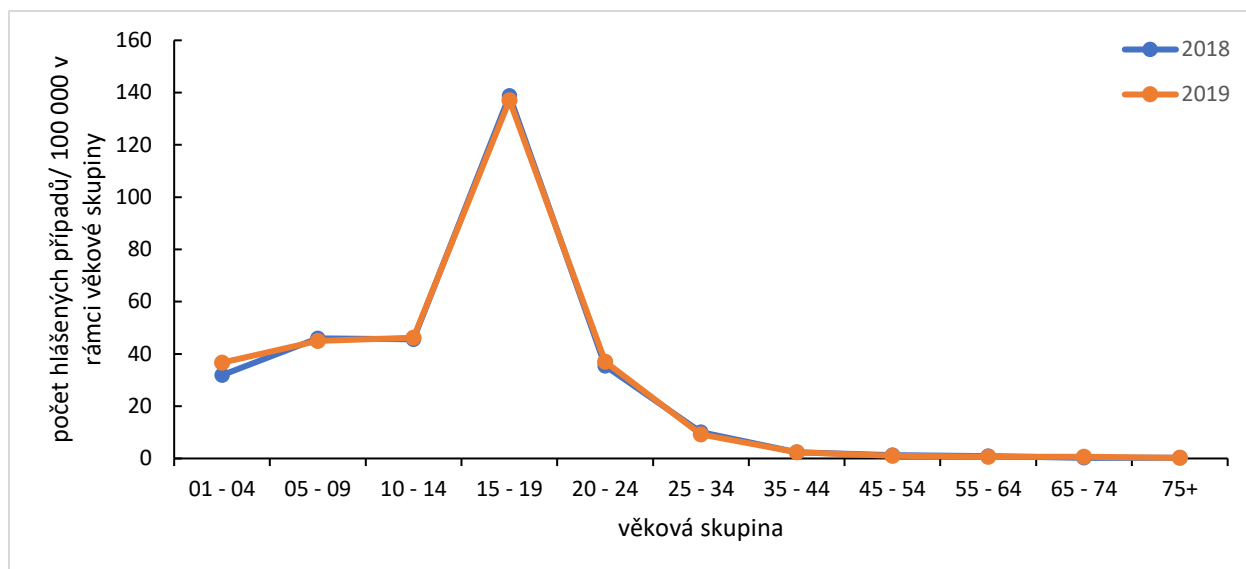
Séroprevalence HHV6 v populaci je vysoká, dosahuje více než 90 % dospělých. Anti HHV7 protilátky mají významnou zkříženou reaktivitu s anti HHV6 protilátkami, což komplikuje případné séroepidemiologické studie (Ihira M. et al., 2001; Ward K. et al., 2002). K primoinfekci oběma viry dochází po poklesu maternálních protilátek a 90 % séropozitivity je u obou virů dosaženo do 2 let života (Tanaka-Taya K. et al., 1996; Hall C. et al., 2006; Bustos D. et al., 2006) Plošná séroprevalenční studie nebyla v České republice nikdy provedena.

1.3.6 Virus Epstein – Barrové (EBV)

V průběhu života se virem Epstein-Barrové promoří více než 90 % populace – (Cohen J., 2000), k promořování dochází zejména v dětství a pubertě, 90 % séropozitivity bylo v UK dosaženo ve věkové skupině 15-19 let – (Kuri A. et al., 2020) – séra z roku 2016 a USA až po 20.roce života (Dowd J. et al., 2013) – séra z roku 2003-2010, (Condon L. et al., 2014). Poslední česká data pochází ze sérologických přehledů z roku 1996, séroprevalence v české populaci dosahovala více než 90 % již ve věkové skupině 5-9 let (Roubalová K., Seeman J., 1998) viz *Graf 7*. Symptomatická primoinfekce (infekční mononukleóza – B27.x) byla nejčastěji hlášena ve věkové skupině 15-19 let viz *Graf 8*, což je ve shodě se zahraničními daty (Kuri A. et al., 2020; Fourcade G. et al., 2017).



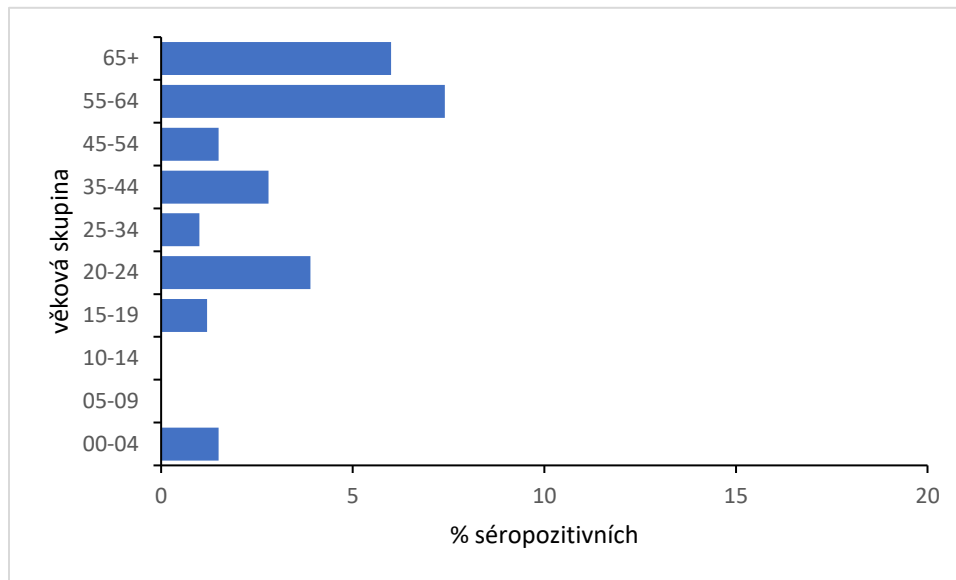
Graf 7: Séropozitivita anti EBNA1 IgG dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, zpracováno z (Roubalová K., Seeman J., 1998)



Graf 8: počet hlášených uzavřených případů syndromu infekční mononukleózy (B27.x) po vyloučení případů vyvolaných CMV (B27.1) na 100 000 obyvatel v rámci věkové skupiny, Česká republika, 2018-2019, ISIN; vztaheno na střední stav obyvatelstva

1.3.7 Lidský herpetický virus (HHV8)

Dominantním mechanismem přenosu HHV8 je v rozvinutých zemích přenos pohlavní cestou (virus se vyskytuje v sekretech pohlavních žláz a slinách), v subsaharské Africe a některých uzavřených domorodých komunitách dochází zřejmě i k vertikálnímu přenosu – shrnuto v (Etta E. et al., 2018). V Evropě a severní Americe je v běžné populaci séroprevalence nízká do 5 % (Moore P., 2000), v ČR jsou data ze sérologických přehledů 1996 – 2,4 % (Suchánková A. et al., 2003) viz Graf 9. Skupinami s vyšší séroprevalencí jsou osoby infikované virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV pozitivní) a muži mající sex s muži (MSM) (Liu Z. et al., 2017; Suchánková A. et al., 2003; Rohner E. et al., 2014; Martró E. et al., 2006) a HIV pozitivita s nízkými hodnotami CD4+lymfocytů představuje rizikový faktor pro rozvoj Kaposiho sarkomu. Ročně je hlášeno v ČR do 20ti případů Kaposiho sarkomu (zdroj ÚZIS, Národní onkologický registr), incidence 0,03-0,1 /100 000 obyvatel, mortalita 0,01-0,04 /100 000 obyvatel, incidence narůstá s věkem, muži jsou dvakrát častěji postiženi než ženy.



Graf 9: Séropozitivita anti HHV8 IgG (lytický antigen) dle věkových skupin, sérologické přehledy 1996, Česká republika, přepracováno ze (Suchánková A. et al., 2003)

1.4 Životní cyklus herpetických virů v makroorganismu

Důležitou vlastností těchto virů je po primoinfekci schopnost navodit latentní stav se schopností znovu se reaktivovat. Primoinfekce může probíhat asymptomaticky, pod obrazem nespecifického horečnatého onemocnění, nebo pod typickým klinickým obrazem – herpetické gingivostomatitidy u HSV1, varicelly u VZV, infekční mononukleózy u EBV, CMV a exanthema subitum u HHV6. Místem vstupu do organismu jsou nejčastěji sliznice hlavně horních cest dýchacích a genitouretrálního traktu. Zde dochází k primárnímu pomnožení na buňkách epitelu a/nebo retikuloendoteliálního systému a jejich dalšímu šíření do organismu. Životní cyklus jednotlivých druhů viru je velmi podobný v rámci podčeledí:

1.4.1 HSV1 a HSV2

Místem vstupu do organismu je dlaždicobuněčný epitel horních cest dýchacích a urogenitálního traktu, infikována může být i porušená kůže. HSV1 jeví vyšší afinitu ke sliznici horních cest dýchacích a spojivkovému vaku a HSV2 ke sliznici genitálního traktu. Zde dochází k primárnímu pomnožení viru a jeho vstupu do volných nervových zakončení senzitivních nervů. Odtud je virus aktivně transportován do těla neuronů v senzitivních gangliích, kde se replikuje a po úvodní

replikaci přetrvává jeho genetický materiál ve formě epizomů. Po infekci neuronů v gangliích (pseudounipolární T Buňky) již není možné virus z organismu trvale odstranit (Whitley R. et al., 2007). Reaktivace probíhá na celou řadu nespecifických podnětů a přesný mechanismus jejího spuštění není znám – shrnuto v (Suzich J., Cliffe A., 2018). Po reaktivaci dochází k replikaci viru v pseudounipolární T buňkách a jeho retrográdnímu transportu na periferii, kde znovu infikuje epitelální buňky. Virus HSV je schopen infikovat široké spektrum buněk in vivo i in vitro. Infekce může generalizovat hematogenní cestou i šířením nervovou tkání (viz model herpetické encefalidity infekcí čichového nervu). (Kukhanova M. et al., 2014). Symptomatické reaktivace HSV jsou v porovnání s VZV četné, menšího rozsahu, nebývá postižen celý míšní kořen. Dochází i k asymptomatickým reaktivacím, kdy je infekční virus vylučován na sliznici – tzv. „shedding“, tyto reaktivace jsou významné pro šíření infekce v populaci (Johnston Ch, Corey L., 2015; Koelle D., Wald A., 2000).

1.4.2 VZV

Místem vstupu infekce do organismu epitel horních cest dýchacích a lymfatická tkáň Waldayerova míšního okruhu, kde dochází k infekci T lymfocytů s homing faktorem pro kůži. Hematogenní cestou dochází k disseminaci do kůže, kde se sekundárně infikují keratinocyty. Zde dochází k vycytání viru do senzitivních nervů a infekci paravertebrálních ganglií senzitivních nervů, k infekci ganglií může dojít i hematogenní cestou – shrnuto v (Moffat J. et al., 2007). Místem latence jsou zejména paravertebrální ganglia senzitivních nervů, kde virus přežívá ve formě epizomů. K reaktivaci dochází zejména při poklesu buněčné imunity blíže neurčeným způsobem. Virus se z ganglií retrográdně šíří na periferii, kde infikuje epitel. Při reaktivaci dochází k infekci satelitních buněk a může dojít k dalšímu šíření po nervové tkáni a meningy (Zerboni L. et al., 2014; Nagel M., Gilden D., 2014; Zerboni L., Arvin A., 2015).

1.4.3 Cytomegalovirus

Místem vstupu infekce do organismu jsou sliznice, zejména nosohltanu ale i urogenitálního systému. Po primárním pomnožení na epitelích dochází k přestupu infekce na buňky monocytomakrofágového systému, dochází k hematogennímu rozsevu a infekci endotelu cév. Endotel cév je pak hlavním místem perzistence viru v organismu a místem reaktivace při poklesu imunitního dohledu. Přes CD34 pozitivní buňky monocytomakrofágového systému jsou infikovány vývody slinných žláz a buňky distálního tubulu ledvin, které jsou pak hlavním zdrojem

intermitentního vylučování viru. Virus je vylučován i v cervikálním sekretu a v mateřském mléce. Životní cyklus podrobně shrnut v (Griffiths P. et al., 2015).

1.4.4 HHV6 typ A, HHV6 typ B

Virus HHV 6 se vyskytuje ve 2 typech, které byly rozděleny do samostatných druhů.

Typ A infikuje širší spektrum buněk in vivo i in vitro a bývá přítomen v glioblastomech, není spojen s typickým klinickým obrazem primoinfekce. Jeho záchyt je vzácný, častější v Africe u HIV pozitivní populace (Bates M. et al., 2009; Boutolleau D. et al., 2006).

Typ B infikuje užší spektrum buněk a je spojen při primoinfekci s obrazem exanthema subitum a promožuje kolem 90 % populace. Životní cyklus obou typů viru není dosud uspokojivě vyřešen, místem vstupu infekce do organismu je zřejmě sliznice horních cest dýchacích a buňky Waldayerova mízního okruhu. Místo latence není spolehlivě identifikováno, zřejmě jím budou buňky monocytomakrofágového systému a jejich progenitory v kostní dřeni. Oba typy se mohou integrovat do genomu a následně být přenášeny v zárodečné linii (Hubáček P. et al., 2009), což ztěžuje DNA diagnostiku (Tanaka-Taya K. et al., 2004). Otázka schopnosti se reaktivovat z integrovaného stavu v zárodečné linii není uspokojivě vyřešena (Strenger V. et al., 2014; Pellett P. et al., 2012).

1.4.5 HHV7

Má minimální klinický význam, při primoinfekci je schopen vyvolat onemocnění podobné exanthema subitum. Místem latence jsou CD4+T lymfocyty.

1.4.6 EBV

Má mezi herpetickými viry nejvýraznější onkogenní potenciál. (Cohen J., 2000; Longnecker R., Neipel F., 2007). Místem vstupu do organismu je sliznice dutiny ústní, zejména epitel jazyka, kde probíhá lytický cyklus. Zde dojde k přestupu infekce na lymfatickou tkáň. Klíčovými buňkami pro infekci jsou B lymfocyty, které jsou transformovány i produktivně infikovány a jsou místem latence (IgD-, CD27+ paměťové B lymfocyty) (Kempkes B., Robertson E., 2015; Hatton O. et al., 2014)

1.4.7 HHV 8

Místem vstupu infekce do organismu jsou sliznice, epitel je produktivně infikován, místem latence jsou B lymfocyty, v nichž po aktivaci dochází k produktivní infekci. Endotel cév je infikován

produktivně, dochází i k jeho transformaci. (Longnecker R., Neipel F., 2007; Aneja K., Yuan Y., 2017; Dittmer D., Damania B., 2016). Virus má onkogenní potenciál a vyvolává Kaposiho sarkom, Castelmanovu multicentrickou nemoc a primární efuzní lymfom (Cesarman E. et al., 2019; Cavallin L et al., 2014).

1.5 Herpetické viry z pohledu veřejného zdraví

Infekce herpetickými viry podléhají hlášení jako všechna infekční onemocnění dle Zákona č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví, ve znění pozdějších předpisů (MKN-10 kódy B00, B01, B02). Systém epidemické bdělosti (pasivní surveillance pravděpodobných případů bez laboratorní confirmace) dle vyhlášky 275 v aktuálním znění (poslední úprava týkající se varicelly je ve Vyhlášce č. 275/2010 Sb.) je uplatňován pouze na infekce vyvolané virem varicella zoster a to primoinfekci – varicellu (B01) a reaktivaci – herpes zoster (B02). Údaje pro účely surveillance jsou sbírány přes ISIN (Informační systém infekční nemoci, do roku 2018 EpiDat), data vkládají na podkladě hlášení infekčních nemocí od lékařů (tzv. červená hlášenka) pověřenými pracovníci Krajských hygienických stanic. Obecně lze považovat všechna tři zmiňovaná onemocnění za podhlášená, a to zejména infekce virem Herpes simplex (B00 dle MNK-10), kde se kumulativní roční počet nahlášených případů dlouhodobě pohybuje do 200 případů.

Preventivní vakcína proti planým neštovicím je v ČR dostupná od roku 2003, patří mezi nepovinná očkování a lze ji kombinovat s vakcínou proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám (MMR). V současnosti se podává ve dvoudávkovém očkovacím schématu, lze ji podat od 9ti měsíců věku dítěte (viz SPC registrační číslo 59/336/02-C, verze revidovaná 19. 12. 2019). Vakcínu lze použít i pro postexpoziční profylaxi, pokud je první dávka podaná do 76 hodin od expozice. Plošná vakcinace se v ČR na rozdíl od 5ti evropských zemí neprovádí (Mészner Z. et al., 2019).

Profylaktická vakcína proti pásovému oparu je indikovaná pro věkovou skupinu 50let a starší, očkovací schéma se liší dle typu vakcíny (živá – Zostavax – 1 dávka, v ČR dostupný od r.2014, konjugovaný rekombinantní glykoprotein E – Shingrix – 2 dávky, v ČR zatím nedostupný), v obou případech se jedná se o nepovinné očkování bez úhrady.

1.6 Vztah lidských herpetických viru k neuroinfekcím

Všechny herpetické viry mohou za specifických podmínek vyvolat systémové onemocnění včetně infekce centrálního nervového systému (CNS), a to jak při primoinfekci, tak při reaktivaci i reinfekci. Obecně se soudí, že herpetické viry vyvolávají 5-10 % nehnisavých zánětů CNS (Cinque P. et al., 2003; O'Sullivan C. et al., 2003; DeBiasi R., Tyler K., 2004).

1.6.1 Neurotropní lidské herpetické viry: HSV, VZV, HHV6

Neurotropismus je akcentovaný zejména u podčeledi Alphaherpesviridae, kde hlavním místem latence jsou pseudounipolární neurony sensorických ganglií, ale virový genom byl detekován i u cca 20 % populace v bílé i šedé hmotě mozkové (Theil D. et al., 2004; Chan P. et al., 1999; Liedtke W. et al., 1993).

1.6.1.1 Sporadická nekrotizující encefalitida

HSV1, méně často HSV2, může vyvolat devastující sporadickou nekrotizující encefalitidu. Toto onemocnění může postihnout všechny věkové skupiny, ale křivka jeho výskytu má bimodální tvar s vrcholem kolem 2 let věku a druhým kolem 60.

Zatím se nepodařilo spolehlivě identifikovat žádné rizikové faktory, které by přispívaly k rozvoji onemocnění (Tyler K., 2004), shrnuto (Whitley R. , 2015). Incidence onemocnění se udává 2-4 na 1 000 000/ rok. Onemocnění má velmi prudký nástup, objevují se fokální neurologické příznaky, časté jsou též těžké psychické změny (změny osobnosti, anomální chování, halucinace – zejména chuťové a čichové). Kožní či slizniční eflorescence se vyskytují nekonstantně.

Bez terapie je sporadická nekrotizující encefalitida smrtelná v 70 % případů a u 90 % přeživších zanechává trvalé neurologické postižení (Raschilas F. et al., 2002). U přeživších se může vyskytnout recidiva onemocnění, podmíněná nejspíše reaktivací viru z neuronů infikovaných latentně při první epizodě herpetické encefalitidy. Laboratorní diagnostika se opírá o průkaz DNA viru HSV v mozkomíšním moku, který může být v nízkém procentu případů první 2 dny klinických příznaků negativní i cytologicky. Proto se doporučuje při podezření na herpetickou encefalitidu s negativním nálezem při prvním odběru vyšetření opakovat třetí den od počátku příznaků. PCR průkaz HSV DNA v MM je výhodný i v případě, že již byla zahájena terapie antivirotiky, protože přetrvává pozitivní i třetí den terapie. Průkaz HSV DNA v MM po 3 týdnech terapie se považuje za nepříznivý prognostický faktor (Raschilas F. et al, 2002).

U 10-25 % vyléčených onemocnění relabuje, je nutno rozlišit relaps na podkladě HSV infekce (je přítomna HSV DNA v MM) a autoimunní anti-NMDAR encefalitidu (Whitley R. , 2015; Bale J., Du Pasquier R., 2015).

1.6.1.2 Benigní aseptická meningitida

Oba typy viru též vyvolávají aseptickou meningitidu s benigním průběhem, která u HSV2 může recidivovat (O'Sullivan C. et al., 2003; Simko J. et al., 2002). Ta se nesprávně nazývá Mollaretova, kvůli průkazu tzv. Mollaretových buněk v MM.

1.6.1.3 Perinatální infekce virem HSV2

K infekci plodu dochází častěji při primoinfekci matky v 3.trimestru těhotenství oproti již dříve promořeným matkám (2 %). K přenosu infekce na plod dochází 5 % transplacentárně, 85 % ascendentně přes porušené plodové obaly (riziko porod déle než 4 hodiny od odtoku plodové vody, invazivní monitorování plodu) nebo při průchodu porodním kanálem a 10 % nezjištěno jak postnatálně (Kimberlin D., 2004). Riziko přenosu HSV2 na plod lze snížit podávání acikloviru od 36.týdne těhotenství až do porodu, čímž se významně sníží vylučování viru matkou (Hollier L., Wendel G., 2008). Infekce novorozence má 3 klinické obrazy, které mezi sebou mohou volně přecházet: mukokutánní forma, meningoencefalitická forma a disseminovaná forma s orgánovým postižením (Kimberlin D., 2004).

Perinatální infekci může vyvolat i HSV1 při primoinfekci u matky. Tyto infekce mají těžší průběh než HSV2 infekce. Diferenciální diagnostiku, laboratorní diagnostiku a terapii stavů spojených s herpes genitalis v těhotenstvím popisuje doporučený postup ČSL JEP (Holub M. et al., 2019).

1.6.1.4 Infekce nervového systému vyvolané VZV

Poměrně častou komplikací VZV primoinfekce bývá cerebellitida (Breuer J., 2003; Marešová V. et al., 2006), dále tento virus vyvolává vaskulitidy mozkových cév (Breuer J., 2003). Tyto vaskulitidy se vyskytují jak u imunodeficientních jedinců (malých cév) tak i u imunokompetentních s časovou vazbou na herpes zoster (velké cévy) (Nagel M., Gilden D., 2015). Reaktivace VZV může být provázena neuritidami, myelitidou, meningitidou – shrnuto v (Gilden D. et al., 2009; Nagel M., Gilden D., 2014; Krbková L. et al., 2014; Roubalová K. et al., 2007) a zvyšuje riziko cévní mozkové příhody (Sundström K. et al., 2015; Forbes H. et al., 2018).

1.6.1.5 Infekce nervového systému vyvolaného HHV6

Také obě varianty viru HHV6 (A i B) infikují nervovou tkáň, zejména astrocyty (Ward K., Clark D., 2009; De Bolle L et al., 2005). Rozporuplné názory panují ohledně encefalidity, kterou může HHV6 vyvolat u imunodeficientních jedinců (Zerr D., 2006; Agut H. et al., 2015). Do současnosti bylo v literatuře popsáno omezené množství případů HHV6 neuroinfekcí u imunokompetentních, kde důležitým diagnostickým vodítkem byl výskyt HHV6 DNA v MM a absence jiného etiologického agens (Ongrádi J. et al., 2017). Přítomnost HHV6 DNA v mozkomíšním moku je často pozorována i u malých dětí při primoinfekci, provázenou febrilními křečemi (Caserta M., 2004). HHV6 je také dáván do souvislosti s etiopatogenezí roztroušené sklerózy, kde byla pozorována aktivní infekce tímto virem v placích (De Bolle L. et al., 2005; Clark D., 2004). Diagnostiku HHV6 infekcí může zkreslit schopnost integrace tohoto viru do lidského genomu, která se vyskytuje v zárodečné linii (nejčastěji chromozómy 1, 17, 22). U české populace byla stanovena prevalence 0.2 % (Hubáček P. et al., 2013).

1.6.1.6 CMV a EBV neuroinfekce

Virus CMV je známým vyvolavatelem chorioretinitidy u HIV pozitivních pacientů a také encefalidity u imunosuprimovaných jedinců (Griffiths P., 2009). CMV infekce bývá též dávána do souvislosti s Guillian–Barré syndromem (Steininger Ch. et al., 2004).

Komplikací těžkého průběhu EBV primoinfekce mohou být encefalopatie (bez záchytu EBV DNA v MM) i encefalitis (Koning M. et al., 2019) a to i při reaktivacích u imunokompromitovaných (Lau J. et al., 2017). Výskyt EBV DNA v MM provází lymfomy CNS (Cinque P. et al., 1993).

1.7 Diagnostika virových zánětů CNS

Diagnostika zánětů CNS se opírá o klinický obraz onemocnění (náhle vzniklý neurologický deficit, meningeální dráždění, poruchy vědomí, často též febrilní stav) a nález morfologických změn prokázaný zobrazovacími metodami (Adam P., 1999; Fletcher J., Barnett R., 2007). Nedílnou součástí je vyšetření mozkomíšního moku – cytologické, biochemické a mikrobiologické (přímé i nepřímé).

1.7.1 Mozkomíšní mok, vznik, funkce, složení, odběr

Mozkomíšní mok (MM) je považován za primárně sterilní tekutinu, ačkoliv metagenomické studie prokázaly přítomnost mikrobiomu i viromu u zcela zdravých jedinců (Ghose Ch. et al., 2019). MM vyplňuje mozkové komory, subarachnoidální prostory a cisterny a vak plen v páteřním kanálu. Pro diagnostiku je cenná tato tekutina tím, že se nachází za hematoencefalickou bariérou a její složení vypovídá o řadě patologických stavů probíhajících v nervové tkáni. Celkový objem činí cca 150-180 ml u dospělého člověka. Je aktivně produkován v choroidálních plexech postranních mozkových komor (v množství cca 500 ml/den). Jeho cirkulaci podporuje pulzace okolních artérií. Z postranních komor odtéká přes *foramen Monroi* do 3. mozkové komory a přes *ductus Sylvii* do 4. komory, odtud přes *foramina Luschkae* do mostomozečkových koutů a přes *apertura foramen Magendi* do velké cerebromedullární cisterny. Zde se proud dělí na 3 části:

- nad mozečkové hemisféry,
- po bázi přes premedulární, prepontinní a interkrurální cisterny a dále pokračující frontálně a laterálně na přední část konvexity a dorzálně přes cisterna ambientes a cisternae venae magnae cerebri do interhemisferálního prostoru a nad okcipitální laloky,
- do zadního spinálního prostoru.

Mozkomíšní mok se vstřebává zejména v arachnoidálních klcích ústících do žilních splavů (Pacchionské granulace) a podél perineurálních štěrbin mozkových a míšních nervů. Plní řadu funkcí, které lze zařadit do následujících 3 kategorií:

- mechanickou – nadlehčování mozku, kompenzace tlakové vlny vznikající srdeční systolou,
- trofickou – regulace extracelulární tekutiny nervové tkáně,
- imunologicko-neuroendokrinní – je místem pro migraci buněk imunitního systému za hematoencefalickou bariérou, médiem pro lokální působky i neuroaktivní hormony.

1.7.1.1 Složení mozkomíšního moku

Mozkomíšní mok je čirá bezbarvá tekutina o hustotě 1006-1009 g/cm³. Iontové složení se liší od plazmy. Chloridy jsou vyšší než v plazmě cca o 20-26 mmol/l, koncentrace Mg iontů je 2násobná proti plazmě. Bílkoviny jsou převážně hematogenního původu, hlavní podíl tvoří albumin a imunoglobuliny. Koncentrace bílkovin jeví ventrikulo-lumbální gradient, přičemž v lumbální oblasti dosahuje 3násobek koncentrace v komorách.

Buňky jsou za normálních okolností hematogenního, lymfogenního nebo z výstelky likvorových prostor. Diferenciální rozpočet vykazuje 62 ± 34 % lymfocytů, 36 ± 20 % monocytů a 2 ± 5 % neutrofilních granulocytů. Erytrocyty se v mozkomíšním moku za fyziologického stavu nevyskytují a v získaném materiálu se vyskytují arteficiálně.

1.7.1.2 Odběr mozkomíšního moku

Odběr mozkomíšního moku se provádí zejména lumbální nebo vzácně subokcipitální punkcí. Za bezpečnější místo pro odběr se považuje lumbální lokalizace pro absenci míchy v místě vpichu. Při odběru je nutno dodržovat následující bezpečnostní pravidla: odběr nelze provést u pacienta s intrakraniální hypertenzí kvůli riziku vzniku conus okcipitalis (expanze mozkového kmene do foramen magnum lebky, nutno provést vyšetření pomocí výpočetní tomografie – CT mozku nebo aspoň vyšetření očního pozadí). Odběr musí být prováděn za přísně sterilních podmínek.

1.7.2 Vyšetření mozkomíšního moku

Vyšetření mozkomíšního moku začíná již lékař při odběru makroskopickým vyšetřením, kdy je povinen zaznamenat vzhled MM (čirý, zkalený, zkrvavený) a jakým způsobem MM odtékal (odkapává, vytéká). Dle možností pracoviště lze provádět i měření tlaku, pod jakým likvor odtéká. Další vyšetření již probíhá v rámci laboratoře. Laboratorní vyšetření mozkomíšního moku vyžaduje multioborovou spolupráci a zpravidla se na něm podílí více pracovišť. Z praktického hlediska lze vyšetření rozdělit do následujících tří skupin:

1. Stanovení provedená na pracovišti klinické biochemie

- biochemická (bazální) vyšetření (iontogram, albumin, bilirubin, glukóza)
- zánětlivé markery
- stanovení počtu buněk s jádry na Fuchs-Rosenthalově komůrce

2. Stanovení provedená na pracovišti imunologie či na specializovaném likvorologickém pracovišti

- stanovení hladin imunoglobulinů (třídy IgG, IgM, IgA, IgE)
- izoelektrická fokusace bílkovin přítomných v mozkomíšním moku
- markery zánětu
- neurodegenerativní markery
- autoprotilátky

- podrobné cytologické vyšetření

3. Stanovení provedená na pracovišti klinické mikrobiologie a virologie

- Specifické protilátky proti neurotropním infekčním agens
- průkaz nukleových neurotropních infekčních agens
- kultivace mozkomíšního moku (bakteriologická a virologická)

Ihned po odběru jsou provedeny bazální biochemické testy: celková bílkovina, Na, K, Cl, glykorrhachie (hladina glukózy v MM), testy musí být paralelně provedeny i v periferní krvi výpočet energetického potenciálu. Souběžně probíhá stanovení počtu buněk s jádry na Fuchs-Rosenthalově komůrce. Na základě těchto vyšetření lze nález rozdělit do 3 základních patologických stavů viz níže:

1. Proteinocytologická asociace (zvýšená celková bílkovina a zvýšený počet buněk)

Nejčastější příčiny:

Purulentní meningitida

- vysoká bílkovina, záplava neutrofilních leukocytů, nízká glykorrhachie
- původcem je nejčastěji bakteriální zánět

Serózní meningitida a meningoencefalitida

- mírně zvýšená bílkovina nebo i normální nález, zvýšený počet mononukleárů i neutrofilních segmentů, nejčastěji do 1000/mm³, glykorrhachie v normě
- původcem bývají nejčastěji virové záněty

2. Proteinocytologická disociace (zvýšená pouze celková bílkovina)

Nejčastější příčiny:

- komprese páteřního kanálu (protruze disku, tumory)
- chronické záněty CNS i neinfekčního původu
- Guillian-Barré syndrom

3. Cytoproteinová disociace (zvýšený pouze počet buněk)

Nejčastější příčiny:

- úvodní fáze virových infekcí CNS
- malignita (karcinomy, hematologické malignity, melanom)

K virologickému vyšetření vede nejčastěji nález proteinocytologické asociace bez hnisavého zánětu (serózní meningitida/meningoencefalitida).

1.8 Virologické vyšetření mozkomíšního moku

Virologické vyšetření mozkomíšního moku lze provést metodami přímými – prokazujícími přímo infekční agens nebo nepřímými prokazujícími protilátkovou odpověď proti danému infekčnímu agens.

1.8.1 Metody nepřímé – průkaz intrathékální syntézy protilátek

Sérologická diagnostika, vzhledem k celoživotní perzistenci herpetických virů v lidském organismu a častým spontánním asymptomatickým reaktivacím bez klinického onemocnění, neposkytuje vždy dostatečné diagnostické vodítko. Sérologický obraz v periferní krvi neodpovídá situaci v nervové tkáni. Validnější informaci proto poskytuje vyšetření intrathékální syntézy protilátek.

Nervová tkáň je imunitně privilegovaná a imunitní odpověď je oddělena hematoencefalickou bariérou od zbytku těla. Produkce protilátek třídy IgG z 90 % vzniká lokálně v CNS, pouze menší frakce přechází přes hematoencefalickou bariéru. Toto množství je přímo závislé na propustnosti hematoencefalické bariéry. IgG syntetizované v CNS jsou polyspecifické, velká frakce má afinitu k jinému antigenu, než je kauzální antigen (Bonnar M., 2014). IgG odpověď pak perzistuje i bez přítomnosti antigenu. Intrathékální produkce virově specifických protilátek se objevuje až kolem 7.-10. dne onemocnění a může pouze dodatečně potvrdit jeho etiologii.

1.8.1.1 Kvalitativní metody ke stanovení intrathékálních protilátek

1.8.1.1.1 Izoelektrická fokusace – „oligoklonální pásy“

Elektroforetická metoda, která používá odlišné migrace bílkovin dle jejich izoelektrického bodu. Stanovení je vždy prováděno paralelně pro sérum a mozkomíšní mok. Pokud dochází k intrathékální syntéze protilátek, objevují se tzv. oligoklonální pásy. Jednou z modifikací této metody lze odlišit i protilátky antigen-specifické.

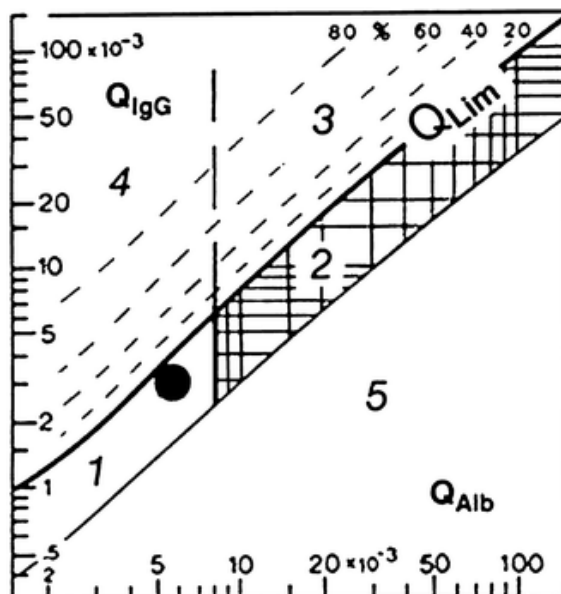
1.8.1.1.2 Immunoblot

Je kvalitativní metodou, kterou lze stanovit i intrathékálně syntetizované protilátky, ale pro detekci herpetických virů má omezené použití pro absenci kvantifikace. Základní význam mají metody kvantitativní.

1.8.1.2 Kvantitativní metody stanovení intrathékální syntézy protilátek

Zahrnují poměr koncentrace plazmatického proteinu (např. albuminu) a imunoglobulinů (G, M, A) v mozkomíšním moku a séru. K provedení je nutné kvantitativně stanovit antigen specifické protilátky (nejčastěji testem na bázi EIA).

V současnosti nejpoužívanějším vzorcem je Reiberův vztah (Reiber H., 1994), kterým se stanovuje jednak stav hematoencefalické bariéry a zároveň jeho pomocí lze stanovit tzv. protilátkový index (AI). Součástí vzorce je i populační variační koeficient (QLim), který byl stanoven na velké populaci viz *Obrázek 4*.



Obrázek 4: Diagram poměru kvantity IgG protilátek v mozkomíšním moku a periferní krvi (séru) za různého stavu hematoencefalické bariéry dle Reibera.

1 – normální stav hematoencefalické bariéry; 2 – dysfunkční stav (porušená); 3 – kombinace poruchy hematoencefalické bariéry a intrathékální syntézy IgG; 4 – průkaz intrathékální syntézy IgG; 5 – laboratorní chyba, stav, který není možné v organismu dosáhnout
Protilátkový index udává poměr kvantity antigen specifických protilátek v séru a mozkomíšním moku korigovaný dle stavu hematoencefalické bariéry.

AI=Qspec/QIgG nebo AI=Qspec/QLim, pokud Qlim<QIgG

Hodnocení: Za pozitivní se považuje hodnota vyšší než 1,5, přičemž hodnoty 1,4-1,6 jsou považovány za šedou zónu. Někteří autoři doporučují šedou zónu rozšířit až k hodnotě 2. Nevýhodou tohoto stanovení je, že se jedná o poměr, který ukazuje, že k intrathékální syntéze dochází, nikoliv jak je masivní. Při interpretaci nelze pominout existenci polyspecifické imunitní odpovědi u chronických zánětů CNS jako je roztroušená skleróza nebo neurosyfilis. U roztroušené sklerózy má existence intrathékálně syntetizovaných protilátek proti spalničkám, zarděnkám, planým neštovicím a herpes simplex diagnostický význam (MRZH reakce) a může dokonce předcházet výskytu oligoklonálních páسů v mozkomíšním moku (Bednářová J., Štourac P., 2009; (Reiber H. et al., 1998; Jarius S. et al., 2017; Bonnan M., 2014). Proto má v akutní diagnostice neuroinfekcí toto vyšetření omezenou roli a nejčastěji používanými jsou metody přímé.

1.8.2 Metody přímé

1.8.2.1 Kultivace mozkomíšního moku

Za zlatý standard virologické diagnostiky bývají považovány kultivační metody, které jsou však pro průkaz herpetických virů v mozkomíšním moku většinou neúčinné a záchyt herpetických virů z tohoto materiálu je raritní. Kultivace biopsie mozkové tkáně z ložiska zánětu se pro svou invazivitu a dostupnost pouze na specializovaných neurochirurgických pracovištích rutinně neprovádí. Vzhledem k obecnému odklonu virologické diagnostiky od kultivačních vyšetření poskytuje toto vyšetření již pouze 7 pracovišť v ČR. V rámci rutinní diagnostiky jsou kultivovány pouze alfaherpesviry a cytomegalovirus, nejčastěji na buněčných liniích derivovaných z lidských fibroblastů. Tyto viry vykazují typický cytopatický efekt. Výsledky kultivačního vyšetření jsou dostupné za 7-21 dní. K dalším nevýhodám patří vulnerabilita virů v biologickém materiálu, již krátkodobé skladování může negativně ovlivnit výsledek vyšetření. Kultivace lymfotropních virů (EBV, HHV6 a HHV8) je náročná, vyžaduje jiné než permanentní buněčné linie, není přítomen typický cytopatický efekt, a proto je nevhodná pro rutinní diagnostiku.

1.8.2.2 Elektronová mikroskopie

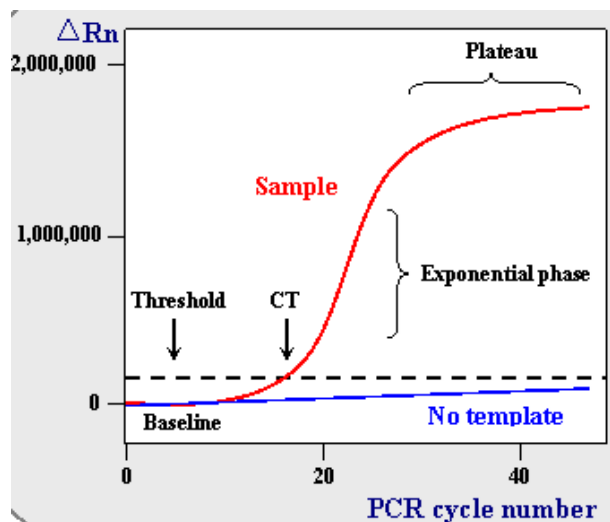
Elektronová mikroskopie se v likvorologické diagnostice uplatňuje jen omezeně pro její malou dostupnost. Metoda je založená na rozpoznání morfologie typické pro herpetické viry (rozměr, kapsida ikosahedrické symetrie, přítomnost obalu). Rozlišení na úrovni podčeledi a druhu je již

omezené. Záchyt herpetického viru elektronovou mikroskopií nemusí znamenat přítomnost infekčního viru v MM, protože například při replikaci CMV se tvoří defektní viriony bez obsahu DNA – dense particles.

1.8.2.3 Metody amplifikace nukleových kyselin

Kvůli výše uvedeným limitacím předchozích metod dochází k všeobecnému příklonu k přímé diagnostice metodami amplifikace virových nukleových kyselin (NAAT, nucleic acid amplification test). O tuto diagnostiku se nyní opírá většina doporučených postupů při zánětech CNS – shrnuto v (Sigfrid L. et al., 2019).

Princip NAATs byl objeven v 80. letech 20. století a umožňuje mnohonásobné namnožení určitého úseku deoxyribonukleové kyseliny (DNA). V případě, že detekovanou nukleovou kyselinou je ribonukleová kyselina (RNA), je nutno nejprve provést její transkripci na DNA (enzym reverzní transkriptáza). Principem metod je namnožení úseku DNA o velikosti do cca 1000 párů bází ohraničeného specifickými oligonukleotidovými sekvencemi – primery. Množství naamplifikované DNA je takové, že je možné ji vizualizovat. Tyto metody se vyskytují ve velkém množství modifikací, základem jsou různé druhy enzymu DNA polymerázy, která pracuje při různých teplotách. Ve virologické diagnostice se uplatnila nejvíce DNA polymeráza pocházející z *Thermophilus aquaticus* a modifikace testu zvaného Polymerázová řetězová reakce (PCR).



Obrázek 5: Real-time PCR (Polymerázová řetězová reakce v reálném čase).

Nárůst množství PCR produktu je detekován jako nárůst fluorescenčního signálu.

Typy PCR z hlediska potřeb virologické diagnostiky je lze rozdělit do 2 skupin.

1.8.2.3.1 End point metody

Amplifikovaná DNA je detekována až po ukončení reakce (fáze plateau) viz *Obrázek 5*. **Error! Reference source not found.** Tyto metody neumožňují stanovení výchozí koncentrace DNA v testovaném materiálu v jedné reakci. Je nutný následný krok detekce amplifikované DNA (PCR produktu) některou z elektroforetických nebo hybridizačních metod.

Ve virologické diagnostice se uplatnila end point PCR designovaná jako multiplex PCR (více setů primerů pro souběžnou detekci více cílů) a nested PCR (vícekolová). Tyto metody se stále uplatňují mimo jiné i pro nízkou finanční náročnost a nižší nároky na přístrojové vybavení oproti real-time metodám.

Nested PCR je 2 kolová PCR reakce s 2 sadami primerů – vnějšími a vnitřními. Vznikla jako metoda s vysokou citlivostí v době, kdy životnost DNA polymerázy byla okolo 30 cyklů, protože de facto umožňovala amplifikovat cílovou sekvenci 60ti cykly. První kolo reakce probíhá s vnější sadou primerů a PCR produkt se přenáší do druhého kola reakce s vnitřní sadou primerů. Tato metoda je náchylná ke kontaminaci; dále viz nevýhody PCR.

1.8.2.3.2 Real-time metody

Množství amplifikované DNA je monitorováno již v průběhu reakce. Sleduje se, v kterém cyklu reakce přechází do logaritmické fáze, tzv. crossing point. Ten je úměrný koncentraci DNA ve výchozím vzorku viz *Obrázek 5*: Real-time PCR (Polymerázová řetězová reakce v reálném čase).. Detekce amplifikované DNA (PCR produktu) probíhá již v průběhu reakce. Metody měření koncentrace DNA v průběhu reakce lze rozdělit do 2 skupin:

1.8.2.3.2.1 Metody měření koncentrace DNA v průběhu reakce – nespecifické

Nespecifické metody používají interkalační činidla a minor groove binding látky (např. ethidiumbromid, SYBR Green, SYBR Gold, LC Green, BEBO). Tyto látky se nespecificky vážou na DNA. Po osvětlení světlem určité vlnové délky emitují světlo jiné vlnové délky, které je následně detekováno. Výhodou je univerzálnost metod a absence potřeby specifických sond. Nevýhodou naopak detekce jakékoliv DNA, včetně nespecifických PCR produktů. Tyto metody také neumožňují detekci 2 PCR produktů v jedné reakci (multiplex PCR).

1.8.2.3.2.2 Metody měření koncentrace DNA v průběhu reakce – specifické

Používají se sondy – krátký oligonukleotid s fluorescenční značkou (např. Rox, Fam, Cy) – tzv. fluoroforem, který je komplementární s amplifikovaným úsekem. Při jeho vazbě s PCR produktem dochází po osvětlení excitačním zářením k emisi světla určité vlnové délky, která je detekována a je sledován její nárůst v čase. Nejčastěji používané typy sond jsou:

- **Hybridizační – FRET** (fluorescent resonance energy transfer). Základem je dvojice specifických hybridizačních sond komplementárních s amplifikovaným úsekem DNA, první je značena na 3' konci fluoresceinem a druhá je 5' konci označena akceptorovým fluoroforem (např. FAM, HEX, Cy3, Cy5, BHQ2). Při reasociační fázi PCR reakce dochází k nasednutí obou sond, díky čemuž dojde k přiblížení fluoresceinu a fluoroforu. Po emisi excitačního záření jej vstřebá fluorescein a předá jeho energii fluoroforu, která emituje světlo určité vlnové délky, které je detekováno.
- **Hydrolyzační – Taq Man**. Je třeba pouze jedna sonda, která má část identickou s amplifikovanou sekvencí a volnými konci. 3' konec je značen zhášecem a 5' konec je značen fluoroforem. Exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy je fluorescenční značka uvolněna od zhášeče a může emitovat světlo dané vlnové délky, které je detekováno.
- **Molecular Beacons**. Sonda má strukturu vlásenky, která udržuje u sebe zhášec a fluorescenční značku. Po nasednutí sondy na specifickou sekvenci dochází k uvolnění fluoroforu a emisi světla.
- **Scorpions**. Také využívá sekundární strukturu sondy. Sonda obsahuje fluorofor i zhášec a je kovalentně vázaná k primeru používanému pro tuto reakci. Po nasednutí sondy na PCR produkt dojde ke konformační změně sondy a uvolnění fluoroforu od zhášeče a emisi světla. Obdobnými technologiemi jsou univerzální primery AmpliFluor, LUX a další.

1.8.2.3.2.3 Analýza křivky tání

Analýza křivky tání (melting curve analysis) je postamplifikační metoda, která umožňuje u některých typů real-time PCR detekci odlišných PCR produktů amplifikovaných stejnou sadou primerů. Principem metody je odlišná teplotní stabilita vazeb dvouřetězců DNA (slabší mezi A-T, silnější mezi G-C). Ve verzi High Resolution Melting je vhodná i pro detekci bodových mutací.

1.8.2.4 Výhody metod na bázi PCR

Vysoká citlivost. Současné PCR metody jsou schopné spolehlivě detekovat okolo 100 kopií nukleových kyselin na ml vzorku. Ve vzorku nemusí být obsažen viabilní virus, což je obrovskou výhodou proti kultivačním metodám.

Rychlost. Metody na principu real-time PCR trvají okolo 2 hodin.

Specifická. PCR metody s detekcí PCR produktu hybridizací nebo reálné metody obsahující specifické sondy mají virtuálně 100 % specifitu. Opatrnost je nutná u metod s detekcí na principu elektroforézy, kde je nutné přesné určení délky PCR produktu. To platí i o real-time metodách s nespecifickými interkalačními barvivy, kdy se v případě pochybností o specifitě amplifikovaného PCR produktu doporučuje gelová elektroforéza.

Nížší rizika laboratorní nákazy při práci s infekčním materiálem oproti kultivaci. Po reakci s lyzačním pufrem při izolaci nukleových kyselin již není testovaný biologický materiál infekční, což je velkou výhodou proti kultivačním metodám.

1.8.2.5 Nevýhody metod na bázi PCR

Vysoká citlivost – riziko kontaminace. Vysoká citlivost PCR metod klade velké nároky na správnou laboratorní praxi. Obecně je důležité používat jednorázový laboratorní plast v kvalitě pro PCR diagnostiku, pečlivá dekontaminace pracovní plochy obsahující DNA ničící činidla, prevence carry-over kontaminace mikrokapičkami z víček mikrozkušavek, používání jednorázových rukavic. Riziko kontaminace hrozí v několika krocích, a proto je vhodné prostorově oddělit izolaci nukleových kyselin, přípravu reakčního roztoku – mastermixu, přidávání vyizolované nukleové kyseliny do mastermixu a práci s PCR produktem. Pro kontrolu každého běhu je proto nutné použít negativní kontrolu – vzorek neobsahující testovanou nukleovou kyselinu a pozitivní kontrolu – vzorek obsahující testovanou NK, nejlépe o známé koncentraci. Dalším bezpečnostním prvkem je použití interního standardu – nezávislé PCR reakce s odlišným templátem, než je testovaná NK v jedné zkumavce. Pokud dojde k inhibici PCR reakce, neamplifikuje se ani interní standard. Dalším bezpečnostním prvkem je amperázový systém. V PCR reakci je použita směs nukleotidů obsahující místo thyminu uracyl, takže výsledný PCR produkt obsahuje uracyl. Před vlastní PCR reakcí je pak začleněn krok degenerace PCR produktu obsahujícího uracyl enzymem amperázou.

Vysoká citlivost – průkaz fragmentu genomu. Jak již bylo výše řečeno, PCR metodou lze amplifikovat pouze fragment genomu. To přináší interpretační problémy, například když se testovaný úsek v genomu vyskytuje ve více kopiích.

1.9 Terapie a profylaxe infekcí vyvolaných herpetickými viry

1.9.1 Antivirotika

Situace v léčbě infekcí vyvolaných herpetickými viry je unikátní díky existenci účinných a relativně málo toxických antivirotik. Přehled antivirotik účinných proti herpetickým virům je v *Tabulka 1*.

Terapie antivirotiky se uplatňuje jak při primoinfekci, tak i při reaktivacích/reinfekcích, zejména u imunokompromitovaných jedinců. Antivirotika jsou také součástí profylaktických postupů zejména u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk a orgánové transplantaci. Dávkování při neuroinfekcích je uvedeno v *Tabulka 2*.

Tabulka 1: Přehled antivirotik užívaných v terapii infekcí vyvolaných herpetickými viry

*Nukleosidová analoga typu aciklovir inhibují lytický cyklus EBV, ale nepotlačují lymfoproliferaci (Pagano J. et al., 2018; Ernberg, I., Andersson, J., 1986).

Generický název	Mechanismus účinku	Spektrum účinku	Nežádoucí účinky
aciklovir	nukleosidový analog, fosforylován virovou thymidinkinázou	HSV, VZV, *EBV	bolesti hlavy, GIT intolerance, fotosenzibilizace, vzácně encefalopatie, halucinace psychotické příznaky, nefropatie
famciklovir	nukleosidový analog, derivát acikloviru s lepším vstřebáváním p.o.	HSV, VZV, *EBV	viz aciklovir
valaciklovir	nukleosidový analog, derivát acikloviru s lepším vstřebáváním p.o.	HSV, VZV, *EBV	viz aciklovir
penciclovir	nukleosidový analog, derivát acikloviru s lepším vstřebáváním p.o.	HSV, VZV, *EBV	viz aciklovir
ganciclovir	Nukleosidový analog, interakce s cytomegalovirovou thymidinkinázou UL 97	CMV, HHV6, HHV7	Neutropenie, anemie, trombocytopenie až pancytopenie, myelosuprese, GIT intolerance, hepatopatie, poruchy funkce ledvin
valganciclovir	Nukleosidový analog, derivát gancicloviru s lepším perorálním vstřebáváním	CMV, HHV6, HHV7	viz ganciclovir
cidofovir	Nukleosidový analog, interakce s cytomegalovirovou thymidinkinázou UL 97	CMV	Neutropenie, bolesti hlavy, nauzea, zvracení, poruchy funkce ledvin (snížení toxicity podáním Probenecidu)
brivudin	Nukleosidový analog	VZV, HSV1	Bolesti hlavy, GIT intolerance, alergické příznaky
maribavir	Inhibitor thymidinkinázy	CMV	
foscarnet	Inhibitor DNA polymerázy	HSV, VZV, CMV, HHV6	GIT příznaky, poruchy funkce ledvin, iontová dysbalance, neuropatie, psychotické příznaky
letermovir	Inhibitor komplexu proteinů UL51, UL56 a UL89 – terminázový komplex	CMV	GIT příznaky, otoky, dušnost, hepatopatie, poruchy srdečního rytmu – fibrilace/flutter síní

Tabulka 2: Dávkování antivirotik v terapii neuroinfekcí vyvolaných herpetickými viry

*použit v případě rezistence ke gancicloviru

**dávkou 15 mg/kg á 8 hodin překračuje dávkování dle souhrnu údajů o léčivém přípravku, ale odpovídá doporučenému postupu SIL ČSL JEP (Sedláček D. et al, 2020).

	Účinná látka	dávka	Délka terapie	Steroidy ano/ne
Sporadická nekrotizující encefalitida (HSV)	aciklovir	10 mg/kg i.v. á 8 hod	14-21 dní	+/-
HSV1 meningitida, HSV2 meningitida primární	aciklovir	10 mg/kg i.v. á 8 hod	7 dní	
HSV2 recidivující meningitida	aciklovir	5-10 mg/kg i.v. á 8 hod	7 dní	
Perinatální HSV encefalitida	aciklovir	20 mg/kg i.v. á 8 hod	21 dní	
VZV encefalitida při primoinfekci	aciklovir	10-15** mg/kg i.v. á 8 hod	14 dní	
Varicellozní cerebellitida	bez terapie			+/-
VZV vaskulitida velkých cév	aciklovir	10-15** mg/kg i.v. á 8 hod	14 dní	+
VZV vaskulitida malých cév	aciklovir	10-15** mg/kg i.v. á 8 hod	14 dní	+
CMV meningoencefalitida	ganciclovir	5 mg/kg i.v. á 12 hod		
	*foscarnet	60 mg/kg i.v. á 8 hod		
HHV6 meningoencefalitida	ganciclovir	5 mg/kg i.v. á 12hod		
	*foscarnet	60 mg/kg i.v. á 8 hod		
HSV1,2 myelitida	aciklovir	10 mg/kg i.v. á 8 hod	14-21 dní	+
VZV myelitida	aciklovir	10-15 mg/kg i.v. á 8 hod	7-21 dní	+

1.9.2 Vakcíny

Infekce vyvolané lidskými herpetickými viry představují závažné zdravotní riziko a primární prevence byla jistě výhodná pro HSV2, VZV a CMV. Jedinou dosud existující účinnou preventivní vakcínou proti herpetickým virům je živá atenuovaná vakcína proti VZV. Mechanismus atenuace není dosud přesně popsán, atenuovaný virus se od svého „rodičovského viru“ liší zejména přítomností bodových mutací. (Quinlivan M. et al., 2011; Zerboni L. et al., 2014). Atenuovaný virus také latentně infikuje paravertebrální ganglia sensorických nervů a je schopen vyvolat herpes zoster i když zřejmě s nižší frekvencí než divoký. Očkování nebrání reinfekci, která však bývá asymptomatická nebo oligosymptomatická. Vztah k počtu reaktivací a jejich závažnosti ještě není spolehlivě dořešen, protože očkovaná populace ještě nedorostla do rizikového věku. Současné studie ukazují na pokles neurologických komplikací (Wolfson L. et al, 2020).

Profylaktická vakcína proti symptomatické reaktivaci = „vakcína proti herpes zoster“ obsahuje identický atenuovaný virus v 14násobné koncentraci proti profylaktické vakcíně, funguje jako booster buněčné imunity (Oxman M. et al., 2005). Zatím se aplikuje v 1 dávkovém schématu, ale v rámci dlouhodobého sledování byl prokázán významný pokles účinku po 5ti až 7 letech (Morrison V. et al., 2015), kdy by bylo zřejmě vhodné přeočkování.

Subjednotkovou vakcínu (glykoprotein E) lze aplikovat v indikaci profylaktické vakcíny. Přes výrazné snahy stále neexistuje registrovaná preventivní ani profylaktická vakcína zamezující HSV1 a HSV2 infekci. Opakovaně selhaly pokusy s glykoproteinem D a různými druhy adjuvans a inaktivovaným virem (Rajčáni J., Ďurmanová V., 2006). V ČR byla v letech 2009–2011 v rámci specifického léčebného programu dostupná terapeutická vakcína proti HSV1 a HSV2, která obsahovala inaktivovaný virus, se sporným účinkem. *Tabulka 3* obsahuje vakcíny, které jsou v současnosti ve fázi klinického zkoušení dle (Xu X. et al., 2019).

Opakovaně selhaly pokusy o vytvoření CMV preventivní i profylaktické vakcíny, jak živé, tak inaktivované. Nyní opět probíhají pokusy s vakcínou na bázi glykoproteinu B (Rieder F., Steininger C., 2014; Krause P. et al., 2013; Anderholm K. et al., 2016) a adoptivním transferem stimulovaných lymfocytů včetně pracovišť v ČR (Němečková Š., Roubalová K., 2019).

Tabulka 3: Preventivní a profylaktické vakcíny ve fázi preklinických a klinických testů dle (Xu X., 2019)

druh	název	popis	Preklinická fáze	Fáze I	Fáze II	Fáze III
živá atenuovaná	HSV1-Tat13	HSV1 s HIV-1 Tat protein	*			
	HSV1 VC214	mutované gK a UL20	*			
	HSV2 Δ NLS15	HSV2 ICPO-virus, Δ NLS	*			
	HSV2 Δ gD216	Delece v gD	*			
	AD47217	Delece v obou kopiích γ 134.5, UL55-56, UL43.5 a US10-12 oblasti	*			
subjednotková	HSV2 gD12	gD s hydroxidem hlinitým a 3-O-deacylovaným monophosphoryl lipidem A				*
	HSV2 gB/gD/MF5918 HSV1 VP11/1219	gB a gD s MF59 VP11/1266-74, VP11/12220-228 a VP11/12702-710	*			*
defektní replikace	HSV2 52920	delece v UL5 a UL29		*		
	HSV1 d12021	delece v ICP4	*			
	HSV1 d9221	delece v ICP4 a ICP27	*			
	HSV1 d9521	delece v ICP4, ICP27 a ICP22	*			
	HSV1 d9721	delece v ICP4, ICP27 a ICPO	*			
	HSV1 vhs-/ICP8- 22	delece v Vhs a ICP8	*			
DNA vakcína	pRSC-gD-IL-2123	HSV1 gD kombinovaný s IL-21	*			
	gD-based polynucleotide vaccine24	kodon optimalizovaná a ubiquitinovaná HSV2 DNA vakcína založená na gD				*
	Vaxfectin® - gD2/UL46/UL4725	gD2/UL46/UL47 s adjuvans Vaxfectin®				*

2 Cíle a hypotézy

Nejrozšířenějšími metodami současnosti pro rutinní diagnostiku herpetických neuroinfekcí jsou NAATs. S rozšířeným využíváním těchto vysoce citlivých metod se začaly v literatuře objevovat zmínky o atypickém průběhu onemocnění (Davies N. et al., 2005), mírnějších formách (O'Sullivan C. et al., 2003; Simko J. et al., 2002) a koinfekcích spojených s nálezem DNA více herpetických virů v mozkomíšním moku (Tang Y. et al., 1999). Objevily se nové nosologické jednotky, jako zoster sine herpette. Dokonce byly odhaleny záchyty DNA herpetických virů v mozkomíšním moku, kdy nález neodpovídal klinickému obrazu zánětu CNS (Davies N. et al., 2005). Také na pracovišti Infekční kliniky FN Bulovka jsme v rámci pilotní studie retrospektivní analýzou zdravotnické dokumentace odhalili případy zánětů CNS, kdy byla v mozkomíšním moku zjištěna DNA herpetických virů, i když klinický i laboratorní nález odpovídal spíše jiné etiologii onemocnění (2x klíšťová meningoencefalitida, 1x lymeská borrelióza, 1x purulentní meningitida) (Šoltysová K. et al., 2005).

Tyto nálezy přináší otázky správné interpretace záchyty DNA ubikvitních patogenů s místem latence v nervovém systému.

Cílem této práce bylo odpovědět na otázky:

- Jak častý je nález DNA neurotropních herpetických virů HSV1, HSV2, VZV a HHV6 při nehnisavých zánětech CNS v mozkomíšním moku u pacientů, kde byla určena jiná etiologie zánětu než infekce herpetickými viry.
- Pokud byla DNA herpetických virů v MM pacientů s aseptickým zánětem jiné než herpetické etiologie zachycena, tak zda tento nález a je klinicky významný pro pacienta.
- Jestli je přítomna HSV DNA v MM pacientů s klinicky manifestovanou reaktivací tohoto viru na periférii (výsev herpes labialis)

2.1 Studie č. 1 Přítomnost DNA neurotropních herpetických virů u pacientů s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie

Prokazovali přítomnost DNA neurotropních herpetických virů (HSV1, HSV2, VZV, HHV6) u pacientů s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie. Charakterizovali jsme průběh onemocnění a závažnost trvalých následků u skupiny pacientů s pozitivním záchytem DNA herpetických virů v mozkomíšním moku. Výsledky testů na přítomnost DNA neurotropních herpetických virů

nebyly dostupné za hospitalizace a neovlivnili terapii sledovaných pacientů. Klinické parametry onemocnění jsme porovnali se skupinou pacientů se stejným známým virovým zánětem CNS, kde přítomnost DNA těchto virů byla vyšetřením vyloučena. Četnost záchytu DNA herpetických virů v MM u pacientů s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie byla porovnána s četností záchytu v MM u kontrolní skupiny pacientů bez zánětlivého cytologického nálezu v mozkomíšním moku. Výsledky studie byly publikovány (Labská K. et al, 2015).

2.2 Studie č. 2 Výskyt HSV 1 DNA v mozkomíšním moku u pacientů s výsevem herpes labialis

U pacientů s purulentní meningitidou bakteriální etiologie dochází v rámci základního onemocnění k přechodnému poklesu buněčné imunity, který se manifestuje masivním výsevem herpes labialis. Pacientům je z důvodů kontroly účinnosti terapie antibiotiky pravidelně odebírán mozkomíšní mok do normalizace cytologického a biochemického vyšetření. Pro účely studie byl vyšetřen MM pocházející z odběru časově co nejbližšímu výsevu herpes labialis.

3 Materiál a metodika Studie č. 1

3.1.1 Pacienti

Do studie bylo začleněno 77 pacientů s enterovirovou meningitidou či meningoencefalitidou a 96 pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou, kteří byli hospitalizováni na Infekční klinice Fakultní nemocnice Na Bulovce v letech 2005-2006. Diagnóza enterovirové meningitidy (meningoencefalitidy) byla stanovena na základě nálezu serózního (nehnisavého) zánětlivého cytologického nálezu v MM (pleocytóza >5 jaderných buněk/mm³ (Fletcher J., Barnett R., 2007) při mikroskopickém vyšetření na Fuchs-Rosenthalově komůrce) a záchytu enterovirové RNA v MM certifikovanou diagnostickou soupravou (metoda RT PCR, Enterovirus Consensus, Argene Biosoft, Francie; provedlo v rámci rutinní diagnostiky pracoviště virologie ZÚ Praha). Diagnóza klíšťové meningoencefalitidy se opírala o nehnisavý zánět v MM a sérologický průkaz akutní infekce virem klíšťové meningoencefalitidy – pozitivní záchyt specifických IgG a IgM protilátek (metoda ELISA, Euroimmun, Německo); provedlo v rámci rutinní diagnostiky pracoviště virologie Zdravotní ústav Praha). Začlenění byli pouze imunokompetentní pacienti (bez anamnestického údaje o imunodeficitu či HIV pozitivitě, bez nádorového onemocnění, bez imunosupresivní terapie). Biologický materiál byl získán při rutinních odběrech, studie byla

provedena se souhlasem etické komise FNB (č.j. 40/EK-Z). Biologický materiál byl testován na přítomnost DNA neurotropních herpetických virů retrospektivně a výsledek testů neovlivnil terapii pacientů.

Skupinu 77 pacientů s enterovirovou meningitidou tvořilo 43 mužů a 34 žen (věkový průměr 13,3 let, medián 12 let, věkové rozmezí 2 roky až 48 let), skupinu 96 pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou tvořilo 63 mužů a 33 žen (věkový průměr 40,5 let, medián 41 let, věkové rozmezí 6–76 let) viz *Tabulka 5*.

Kontrolní skupinu tvořilo 107 pacientů, u kterých byla v roce 2005 provedena lumbální punkce z diagnostických důvodů (meningismus při febriliích, séropozitivita lymeské borreliózy). Skupinu tvořilo 60 mužů a 47 žen (věkový průměr 24 let, medián 16 let, věkové rozmezí 4-76 let) viz *Tabulka č. 5*.

3.1.2 Sledované parametry

Klinický průběh onemocnění byl sledován po dobu hospitalizace, po propuštění byli pacienti standardně ambulantně kontrolováni po 1, 3 a 6ti měsících. Sledovány a analyzovány byly zejména tyto parametry:

- Příznaky onemocnění při přijetí (febrilie, známky meningeálního dráždění, neurologické postižení, subjektivní stížnosti), délka trvání onemocnění před přijetím, základní anamnestické údaje (věk, pohlaví, přítomnost interních onemocnění).
- Průběh onemocnění během hospitalizace (délka febrilní periody, subjektivní délka trvání příznaků, přítomnost neurologického postižení při dimisi, délka antiedematózní terapie, délka terapie glukokortikoidy, přítomnost komplikací onemocnění), výsledky laboratorních vyšetření krve (krevní obraz a diferenciální počet leukocytů, sedimentace za 30 min., C reaktivní protein, jaterní testy: bilirubin celkový, AST, ALT), mozkomíšního moku (vyšetření na Fuchs-Rosenthalově komůrce – počet lymfocytů a neutrofilních segmentů, glykorrhachie, laktát, celková bílkovina) a výsledky vyšetření zobrazovacími metodami (všichni EEG, CT jen v případech indikovaných ošetřujícím lékařem).
- Zdravotní stav pacientů při kontrolách – trvání neurologického postižení, přítomnost subjektivních obtíží, EEG (pokud byly při iniciačním vyšetření přítomny abnormality).

U kontrolní skupiny klinický stav sledován nebyl.

3.1.3 Laboratorní metody

Odběr mozkomíšního moku lumbální punkcí byl proveden z diagnostických důvodů průměrně 2. den hospitalizace (v rozmezí 1.-4. den). Pro účely studie byly využívány zbytky tohoto materiálu po bazálním biochemickém a cytologickém vyšetření (vyšetření na Fuchs-Rosenthalově komůrce – počet lymfocytů a neutrofilních segmentů, glykorrhachie, laktát, celková bílkovina). Vzorky mozkomíšního moku byly krátkodobě skladovány při +4 °C, do 24 hodin byly uskladněny do minus 50 °C v nízkoadhezivních mikrozkušnicích, aby se bránilo vazbě nukleových kyselin na stěnu zkumavky. Izolace DNA herpetických virů byla prováděna certifikovanou soupravou (QiampDNA minikit, Qiagen, Dánsko) protokolem „Body fluid protocol“ dle návodu výrobce. Objem izolovaného vzorku byl 200 µl, izolátu 50 µl. Do provedení testu byly izoláty skladovány v minus 20°C. Aby se bránilo poklesu nálože virové DNA v izolátu během skladování, byl interval mezi izolací nukleové kyseliny a provedením PCR nejdéle 1 týden a izoláty byly před použitím zahřívány na 95 °C/2 min. (snížení adheze na stěnu mikrozkušnic). DNA HSV1 a HSV2 byla amplifikována v jedné reakci, sekvence primerů byla převzata z (Cassinotti P. et al., 1996), VZV DNA byla amplifikována primery dle publikace (Liedtke W. et al., 1993) a HHV6 DNA dle práce (Yamanishi K. et al., 1993) (úsek společný pro varianty A a B). Reakce byla prováděna ve 2 běžích s různými sadami primerů vždy v celkovém objemu reakční směsi 25 µl, z 1. reakce do 2. reakce bylo přenášeno 2,5 µl templátu. Složení reakční směsi, teploty annealingu a počet cyklů jsou uvedeny v *Tabulka 4*.

Každá reakce obsahovala negativní kontrolu (slepý vzorek, jehož izolace proběhla zároveň s ostatními vzorky) a pozitivní kontrolu (naředěný izolát DNA virového kmene). Produkty PCR byly detekovány elektroforézou na 3 % agarózovém gelu po obarvení ethidiumbromidem. Pro kontrolu citlivosti byla v každé reakci používána slabě pozitivní kontrola, pokud nedošlo k její amplifikaci, test byl opakován.

Protože mezi známé nevýhody metody nested PCR patří možnost vzájemné kontaminace vzorků přenosem produktů reakce (carry over kontaminace), byla její prevenci věnována velká pozornost. Reakční směs byla připravována odděleně v boxe s laminárním prouděním, nanášení templátu pro 1. a 2. běh reakce bylo prováděno v jiných místnostech a byly používány 2 sady automatických pipet s filtrovanými špičkami. Zkuševky byly otvírány pomocí filtračního papíru, aby nedošlo ke kapénkovému přenosu. Vzorky byly vyšetřovány vždy párově, při pozitivním výsledku byl test opakován. Použité metody pro průkaz HSV1 DNA, HSV2 DNA a VZV DNA

byly validovány pomocí panelu vzorků získaných z Quality Control for Molecular Diagnostics (dar Národní Referenční Laboratoře pro herpetické viry, Státní zdravotní ústav).

Tabulka 4: Popis složení reakční směsi a reakčních podmínek

	cyklus	Koncentrace MgCl ₂ (mM)	Koncentrace primerů (pmol)	Koncentrace nukleotidů (mM)	Koncentrace DNA polymerázy (počet jednotek / reakce)	Objem templátu (μl)
HSV1/2 I. běh	95°C-3min, (95°C-30s, 55°C-30s, 72°C-30s) 35x	1,5	*12,5	*0,4	1,25	5
HSV1/2 II. běh	95°C-3min, (95°C-30s, 65°C-30s, 72°C-30s) 35x	1,5	*12,5	*0,2	1,25	2,5
VZV I. běh	95°C-3min, (95°C-30s, 60°C-30s, 72°C-30) 35x	1,75	*12,5	*0,2	1,25	5
VZV II. běh	95°C-3min, (95°C-30s, 60°C-30s, 72°C-30) 35x	1,75	*12,5	*0,2	1,25	2,5
HHV6 I. sběh	95°C-3min, (95°C-30s, 43°C-30s, 72°C-30) 35x	1,5	*12,5	*0,2	1,25	5
HHV6 II. běh	95°C-3min, (95°C-30s, 50°C-30s, 72°C-30) 35x	1,5	*12,5	*0,2	1,25	2,5

Metoda pro průkaz DNA HSV1, HSV2 a VZV byla 100 % specifická. Citlivost metod se pohybovala pro HSV1 kolem $2 \cdot 10^3$ kopií virového genomu/ml vzorku, pro HSV2 byla o něco nižší; $3 \cdot 10^4$ kopií DNA/ml vzorku. U VZV byla dosažena citlivost cca 10^3 kopií virové DNA/ml vzorku. Pro validaci metody na průkaz HHV6 DNA nebyl k dispozici kontrolní panel vzorků, proto byla tato metoda ověřena pouze na základě vyšetření pozitivního kontrolního vzorku HHV6 A DNA z Národní referenční laboratoře pro herpetické viry. Na základě titrace této kontroly byla stanovena citlivost naší reakce cca 10^2 kopií HHV6 DNA/ml vzorku.

3.1.4 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení klinického průběhu ve sledovaných parametrech (viz výše) bylo provedeno po ukončeném jednoletém sledování biostatistikem. Jako statistické metody byly zvoleny Fisherův přesný test pro proměnné udávané ve formě škály a Mann-Whitneyův a Wilcoxonův test pro proměnné kontinuálního typu dat. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti 0,05 a nižší. Porovnáván byl klinický průběh onemocnění u pacientů s ověřenou neuroinfekcí bez průkazu DNA herpetického viru v MM a pacientů se zánětem CNS a záchytem DNA herpetického viru v MM.

4 Výsledky Studie č. 1

Byla zavedena a validována metodika nested PCR pro detekci DNA virů HSV1, HSV2, VZV a HHV6 v mozkomíšním moku. Touto metodikou bylo vyšetřeno 280 pacientů (96 pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou, 77 pacientů s enterovirovou meningitidou a meningoencefalitidou a 107 pacientů v kontrolní skupině). Bylo identifikováno 13 pacientů s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie a výskytem DNA herpetického viru v mozkomíšním moku (viz *Tabulka 5*).

DNA viru HSV1 byla nalezena u 2 pacientů, DNA viru HSV2 byla přítomna u 3 pacientů, DNA viru VZV u 4 pacientů, DNA viru HHV6 u 3 pacientů. U jednoho pacienta byla zachycena v MM současně DNA viru VZV a HHV6. Základní údaje o těchto pacientech jsou uvedeny v *Tabulka 6*.

Tabulka 5: Věk a pohlaví pacientů ve skupinách s nehnisavým zánětem CNS a kontrolní skupině

sledovaná skupina		Klíšťová meningoencefalitida	Enterovirová meningoencefalitida	Kontrolní skupina
počet pacientů		96	77	107
věk (roky)	medián	41	12	16
	věkové rozmezí	6-76	2-48	4-76
pohlaví	muži	63	43	60
	ženy	33	34	47
počet pacientů se zachycenou DNA v MM				
HSV1		1x	1x	
HSV2			2x	1x
VZV		4x		
HHV6		1x	3x	
VZV+HHV6		1x		

Neurologické postižení mělo vždy přechodný charakter a nález na EEG zahrnoval pouze abnormality difuzního charakteru. Nález ložiskového postižení na EEG, který je uváděn jako typický pro sporadickou nekrotizující encefalitidu, nebyl zaznamenán. Nikdo z pacientů neměl v předchorobí ani během hospitalizace výsev herpes simplex, herpes genitalis nebo herpes zoster. Klinický průběh onemocnění a výsledky laboratorních vyšetření byly podrobně sledovány u 173 pacientů, z toho 96 pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou a 77 s enterovirovou meningitidou a meningoencefalitidou.

Průběh onemocnění byl srovnáván mezi skupinami s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie a výskytem DNA herpetického viru v MM (n=13) a s nehnisavým zánětem CNS známé etiologie bez záchytu DNA herpetického viru v MM (n=160). Byl prokázán statisticky významný rozdíl v množství celkové bílkoviny v mozkomíšním moku a závažnosti EEG nálezu za hospitalizace. Statisticky nebyl prokázán rozdíl v klinickém stavu pacientů při přijetí, v průběhu hospitalizace, v cytologickém nálezu v mozkomíšním moku ani při následném sledování viz

Tabulka 7, Tabulka 8 a

Tabulka 9.

Tabulka 6: Klinické formy onemocnění u pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie a paralelním záchytem DNA herpetických virů v mozkomíšním moku

DNA zachyceného viru	Forma onemocnění	Věk (roky)	pohlaví	Neurologické postižení	Nález na EEG
VZV	Klíšťová meningitida	61	muž	Bez postižení	Normální nález
VZV	Klíšťová meningitida	32	muž	Přechodně třesy aker a bolesti hlavy	Mírná difuzní abnormita
VZV	Klíšťová meningoencefalitida	56	žena	Bez postižení	Mírná difuzní abnormita
VZV	Klíšťová meningoencefalomyelitida	32	muž	Přechodně frustní paraparéza DK	Mírná difuzní abnormita
VZV+ HHV6	Klíšťová meningoencefalitida	52	žena	Přechodně bolesti hlavy a porucha spánku	Mírná difuzní abnormita
HHV6	Klíšťová meningoencefalitida	36	muž	Titubace	Normální nález
HSV1	Klíšťová meningoencefalitida	35	muž	Bez postižení	Normální nález
HSV1	Enterovirová meningoencefalitida	12	žena	Bez postižení	Normální nález
HSV2	Enterovirová meningitida	14	žena	Přechodně bolesti hlavy	Normální nález
HSV2	Enterovirová meningitida	24	žena	Přechodně jemný třes aker	Mírná difuzní abnormita
HHV6	Enterovirová meningitida	6	muž	Bez postižení	Mírná difuzní abnormita
HHV6	Enterovirová meningitida	11	muž	Bez postižení	Mírná difuzní abnormita
HHV6	Enterovirová meningitida	6	muž	Bez postižení	Středně závažný difuzní nález

Tabulka 7: Porovnání klinického průběhu laboratorního nálezu u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku, výsledky statistického vyhodnocení kardinálních atributů

*Vzhledem k povaze škály uveden medián

	Pacienti bez HV DNA		Pacienti s HV DNA		p
	Průměr (směrodatná odchylka)		Průměr (směrodatná odchylka)		
Věk (roky)	28.4	(18.5)	29	(18.2)	0.568
Délka hospitalizace (dny)	11.8	(4.2)	11.8	(3.3)	0.496
Délka onemocnění před hospitalizací (dny)	3.4	(3.4)	3.4	(3.1)	0.381
Délka trvání febrilií (dny)	2.3	(1.8)	2.5	(1.9)	0.25
Délka trvání subfebrilií (dny)	1.4	(1.2)	1.2	(0.9)	0.994
Délka trvání bolestí hlavy (dny)	3.8	(2.5)	3.7	(2.8)	0.636
Délka terapie manitolem (dny)	3.8	(1.3)	3.5	(0.9)	0.397
Den lumbální punkce od začátku onemocnění (dny)	5.1	(3.4)	4.1	(2.0)	0.938
Počet leukocytů v krevním obraze (10exp9/l)	11	(4.0)	10.1	(2.7)	0.933
C-reaktivní protein v krvi (mg/l)	13.7	(16.6)	15.4	(11.4)	0.376
Počet lymfocytů v MM (počet/3 v ml)	343.3	(1127.5)	202.5	(124.9)	0.714
Počet neutrofilních segmentů v MM (/3v ml)	130.2	(175.1)	139.2	(150.9)	0.893
Celková bílkovina v MM (g/l)	0.7	(0.3)	0.9	(0.3)	0.013
Závažnost EEG nálezu za hospitalizace (škála 1-4)		*2		*2	0.047

Tabulka 8: Porovnání klinického průběhu a terapie za hospitalizace a při propuštění u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku

Použité škály: 1 – příznaky slabě vyjádřeny, 2 – příznaky plně vyjádřeny viz popis

*Binární atributy, 0 – jev nepřítomen, 1 – jev přítomen

	Pacienti bez DNA herpesvirů		Pacienti s DNA herpesvirů		p	
Pohlaví pacientů	M	65,2 %	M	71,4 %	0.737	ns
	Ž	34,8 %	Ž	28,6 %		
Cefalea při přijetí	0	6,7 %	0	0 %	0.174	ns
	1	91 %	1	85,7 %		
	2	2,2 %	2	14,3 %		
Zvracení při přijetí	0	38,2 %	0	28,6 %	0.477	ns
	1 – nauzea	22,5 %	1	42,9 %		
	2 – zvracení	39,3 %	2	28,6 %		
Febrilie při přijetí	0	0 %	0	0 %	0.164	ns
	1 – do 38 °C	3,4 %	1	14,3 %		
	2 – nad 38 °C	96,6 %	2	85,7 %		
Další neurologické příznaky při přijetí	0	45,5 %	0	57,1 %	0.551	ns
	1	54,4 %	1	42,9 %		
Meningeální dráždění při přijetí	0	30,3 %	0	28,6 %	0.727	ns
	1	40,4 %	1	28,6 %		
	2	29,2 %	2	42,9 %		
Encefalitické příznaky při přijetí	0	34,8 %	0	42,9 %	0.856	ns
	1	62,9 %	1	57,1 %		
	2	2,2 %	2	0 %		
Přítomnost parézy při přijetí	0	95,5 %	0	85,7 %	0.267	ns
	1	4,5 %	1	14,3 %		
Antiedematózní terapie manitolem	0	7,9 %	0	0 %	0.441	ns
	1	92,1 %	1	100 %		
Antiedematózní terapie glukokortikoidy	0	69,7 %	0	85,7 %	0.368	ns
	1	30,3 %	1	14,3 %		
Přítomnost neurologických příznaků při propuštění	0	74,2 %	0	85,7 %	0.497	ns
	1	25,8 %	1	14,3 %		

Tabulka 9: Porovnání klinického průběhu při kontrolách po propuštění (1.,3. a 6.měsíc) u skupin pacientů s nehnisavým zánětem známé virové etiologie s a bez paralelního záchytu DNA herpetických virů v mozkomíšním moku.

Binární atributy, 0 – jev nepřítomen, 1 – jev přítomen

	Pacienti bez DNA herpesvirů		Pacienti s DNA herpesvirů		p	
Přítomnost neurologických následků kontrola 1. měsíc objektivně	N=74		N=4		0,874	ns
	0	45,9 %	0	50,0 %		
	1	54,1 %	1	50,0 %		
Přítomnost neurologických následků kontrola 1.měsíc subjektivně	N=76		N=4		1	ns
	0	75,0 %	0	75,0 %		
	1	25,0 %	1	25,0 %		
Přítomnost neurologických následků kontrola 3. měsíc objektivně	N=43		N=3		0,315	ns
	0	74,4 %	0	100 %		
	1	25,6 %	1	0 %		
Přítomnost neurologických následků kontrola 3. měsíc subjektivně	N=38		N=3		0,621	ns
	0	78,9 %	0	66,7 %		
	1	21,1 %	1	33,3 %		
Přítomnost neurologických následků kontrola 6. měsíc objektivně	N=35		N=2		0,522	ns
	0	82,9 %	0	100,0 %		
	1	17,1 %	1	0 %		
Přítomnost neurologických následků kontrola 6. měsíc subjektivně	N=34		N=3		0,075	ns
	0	79,4 %	0	33,3 %		
	1	20,6 %	1	66,7 %		

Klinický průběh onemocnění u pacientů se záchytem DNA herpetických virů v MM byl benigní a žádný z těchto pacientů nebyl léčen antiviroty. V kontrolní skupině byl zaznamenán pouze 1 výskyt HSV2 DNA.

5 Materiál a metodika Studie č. 2 – Výskyt HSV DNA v mozkomíšním moku u pacientů výsevem herpes labialis

5.1.1.1 Pacienti

Mozkomíšní mok 11 pacientů (demografické údaje a etiologie viz *Tabulka 10*) s purulentní meningitidou komplikovanou výsevem herpes labialis byl vyšetřen na přítomnost DNA virů HSV a varicella zoster (VZV). Vzorky MM (n=24) byly odebrány při kontrolních lumbálních punkcích (1-6 na pacienta) a skladovány při minus 50 °C do zpracování.

5.1.1.2 Laboratorní metody

Detekce DNA byla provedena in-house metodou nested PCR s detekcí na agarózovém gelu barveném ethidiumbromidem (popis viz výše). Pozitivní výsledky ověřeny komerčním kitem (LightCycler HSV1/2 qual kit, Roche) metodou real-time PCR (bez kvantifikace).

Tabulka 10: Základní demografická data pacientů s purulentní meningitidou a výsevem herpes labialis, u kterých byl opakovaně vyšetřován mozkomíšní mok při kontrolních lumbálních punkcích

	pohlaví	věk	Etiologie purulentní meningitidy	Počet vzorků mozkomíšního moku
1	M	67	nezjištěna	1
2	M	21	<i>Neisseria meningitidis</i> skup. B	1
3	Ž	57	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
4	Ž	75	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
5	M	21	<i>Neisseria meningitidis</i> skup. C	1
6	M	46	<i>Staphylococcus aureus</i>	3
7	Ž	69	nezjištěna	2
8	Ž	57	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
9	Ž	78	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
10	Ž	52	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
11	Ž	73	nezjištěna	2

6 Výsledky Studie č.2

Podarilo se nám zachytit 1 výskyt HSV DNA v MM u pacientky s pneumokokovou purulentní meningitidou. Tato pacientka zároveň trpěla mnohočetným myelomem. Výsev herpes labialis se u ní objevil 6. den onemocnění a pozitivní vzorek MM byl ze 7. dne. Zobrazovacími metodami nebyly zastiženy změny typické pro sporadickou nekrotizující encefalitidu (SNE) viz kazuistika.

6.1.1 Kasuistika

Padesátisedmiletá žena byla 2 roky léčena pro mnohočetný myelom, který byl zachycen ve klinické stadiu IIIB (osteolytická ložiska v kalvě, pánvi, kompresivní fraktura L1). Před 2lety prodělala autologní transplantaci kostní dřeně (KD), kterou bylo dosaženo parciální remise. Po 20ti měsících proběhl relaps (KD 39 % buněk s fenotypem plazmocytů) a zahájena léčba thalidomidem 200 mg/den.

Stav byl komplikován pravostrannou pneumonií nezjištěné etiologie, která byla za hospitalizace na interním oddělení empiricky léčena kombinací piperacilin/tazobaktam a flukonazol. Thalidomid byl vysazen.

2. den od nástupu příznaků pneumonie se rozvíjí delirantní stav a meningeální syndrom, dle CT pravostranný korový edém hemisféry. 3.den od nástupu příznaků provedena lumbální punkce s nálezem hnisavého zánětu. V MM metodou PCR zachycen *Streptococcus pneumoniae*, který se nepodařilo kultivačně prokázat. Pacientka byla stejný den přeložena na JIP infekční kliniky.

5. den od počátku příznaků byla pacientka intubována pro respirační insuficienci a prohlubující se poruchu vědomí, tento den došlo k **výsevu herpes labialis**.

6. den byla provedena kontrolní LP, kterou potvrzen ústup zánětlivého nálezu v MM, ale stále přetrvávají vysoké hladiny laktátu. Pro trvající febrilní špičky byla provedena změna antibiotické terapie na meropenem.

Retrospektivně při PCR vyšetření zbytku MM na přítomnost HSV a VZV DNA byla **zjištěna HSV 1 pozitivita**.

8. den od nástupu příznaků pneumonie bylo provedeno CT hlavy, kde bylo zachyceno rozšíření subdurálního prostoru frontotemporálně vpravo, nález byl hodnocen jako suspektní empyém.

10. den od nástupu příznaků pneumonie byla provedena neurochirurgická evakuace ložiska – jednalo se pouze hygrom, posléze dochází k přechodnému zlepšení stavu s poklesem zánětlivých parametrů.

14. den od nástupu příznaků pneumonie provedena tracheostomie. Výkon byl komplikován masivním krvácením do dutiny ústní, pro které byla provedena tamponáda nosu a hypopharyngu.

16. den od nástupu příznaků pneumonie pro elevaci jaterních testů , která hodnocena jako suspektní infiltraci jater mnohočetným myelomem, zahájena bolusová terapie dexamethasonem (40mg 1x denně, 4 dny).

21. den od nástupu příznaků pneumonie opět vzestup teplot, rozvoj ventilátorové pneumonie (etiologie *Pseudomonas aeruginosa*, rezistentní k meropenemu).

25. den od nástupu příznaků pneumonie (4. den od nástupu příznaků ventilátorové pneumonie) provedena dle výsledků kultivačního vyšetření změna ATB terapie na cefoperazon/sulbaktam, o 2 dny později rozšířena o kolistin.

30. den od nástupu příznaků pneumonie zahájena 7denní léčba linezolidem pro suspektní infekci krevního řečiště koaguláza negativními stafylokoky.

36. den od nástupu příznaků pneumonie se objevilo u pacientky krvácení za žaludku pro difuzní hemorhagickou gastropatie, pacientce byly opakovaně podány transfuze. I přes intenzivní terapii u pacientky přetrvávala oběhová nestabilita, arytmie, pacientka postupně chřadne.

59. den od nástupu příznaků pneumonie rozvoj septického šoku, masivní krvácení, exitus letalis

Předpokládaná etiologie sepse: *Klebsiella oxytoca* Amp C, *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumani* dýchací cesty, *Klebsiella oxytoca* ESBL – močové cesty

7 Diskuze

Diagnostika neuroinfekcí vyvolaných herpetickými viry se v současnosti opírá hlavně o záchyt DNA PCR diagnostikou (Boivin G., 2004; Smith C., Khanna R., 2013; Sigfrid L. et al., 2019). Vzhledem k malému množství virové DNA v mozkomíšním moku jsou metody nastaveny na vysokou citlivost a u virů HSV1, HSV2 a VZV v současnosti převládají metody s kvalitativním průkazem v designu multiplex PCR. Kvantitativní metody typu real-time PCR s CE-IVD certifikací jsou významně nákladnější. Proto jsme volili citlivou metodiku, která však má nevýhody možné kontaminace. Té jsme čelili výše uvedenými prostředky a za pozitivní záchyt jsme považovali pouze opakovaný pozitivní výsledek testu.

Naší studií se podařilo potvrdit existenci atypických záchytů DNA herpetických virů při neuroinfekcích vyvolaných jiným agens. Protože imunitní dohled nad herpetickými viry je zajišťován hlavně buněčnou imunitou (Cunningham A. et al, 2006; Egan K. et al., 2013), shrnuto v (Zhang J. et al., 2017), která s věkem klesá, předpokládali jsme vyšší výskyt virové DNA u starších pacientů. Proto byl nález DNA herpetických virů u mladších pacientů poměrně překvapivý, zejména 2 záchyty HSV1. Nález může souviset s vyšší četností reaktivací těchto virů v této věkové kategorii. U HSV je známo, že četnost a rozsah reaktivací se snižuje s délkou doby od primoinfekce (Wald A., 2004). Relativně vysoký záchyt HHV6 v MM u malých dětí by mohl souviset s podobným chováním i u tohoto viru. Naopak, reaktivace VZV u pacientů mladšího věku je vzácným jevem, o čemž svědčí i velmi nízký výskyt herpes zoster u těchto pacientů (Oxman M. et al, 2005). To potvrzují i naše data. Záchyt DNA viru VZV ve skupině pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou byl poměrně vysoký (v našem souboru dosáhl 5 %), v jednom případě se dokonce podařil společný záchyt VZV a HHV6 DNA a byl nulový ve skupině pacientů s enterovirovou meningitidou. Bezpříznakové záchyty viru VZV v krvi již byly popsány (Mainka C. et al, 1998; Levin M., 2014), ale v MM byly spojovány s neuritidami bez výsevu herpes zoster (Gilden D. et al., 2009; Persson A. et al., 2009).

Dynamika perzistence virové DNA v mozkomíšním moku při neuroinfekci či reaktivaci viru v CNS není příliš známá. Údaje jsou pouze u velmi malých skupin léčených pacientů se sporadickou nekrotizující encefalitidou, kdy je virus HSV v mozkomíšním moku detekován i 5 dní od zahájení terapie (Raschilas F. et al, 2002; Schloss L., et al., 2009; (Ramirez K. et al.,2018), u infekcí novorozenců je persistence HSV DNA spojena se špatnou prognózou onemocnění (Mejías A. et al., 2009; Otto W. et al., 2016). Údaje u ostatních virů chybí, zejména pro neetičnost

provádění lumbální punkce u pacientů, jejichž klinický stav se již upravil. Zajímavé proto byly záchyty HSV2 DNA u 3 pacientů, z nichž pouze jedna pacientka (současně léčena pro gonoreu) měla anamnestický údaj o výsevech herpes genitalis bez recentního výsevu. Reaktivace herpetických virů jsou běžné i u imunokompetentních jedinců a DNA virů HHV6 i VZV jsou episodicky detekovatelné v krvi bez klinických příznaků (Caserta M. et al., 2004; Mainka C. et al., 1998; Levin M., 2014).

Reaktivace v kompartmentu nervové tkáně jsou zřejmě vzácnější, jak vyplývá ze studií o efektivitě PCR vyšetřování mozkomíšního moku. Tyto studie potvrzují téměř nulový záchyt herpetických virů u pacientů bez zánětlivého cytologického nálezu v mozkomíšním moku (Simko J. et al, 2002; Tang Y et al., 1999). To se podařilo prokázat i v naší kontrolní skupině 107 pacientů.

Statistická analýza prokázala vyšší hodnoty celkové bílkoviny v mozkomíšním moku a mírně závažnější EEG nález při prvním vyšetření u pacientů s přítomností DNA herpetických virů v MM. Hodnoty celkové bílkoviny u pacientů s DNA herpetického viru nebyly výrazně vyšší (0,7 g/l versus 0,9 g/l, normální hodnoty pro dospělého 0,4-0,6 g/l), pohybovaly se v hodnotách obvyklých pro nehnisavé záněty CNS a rozhodně by jich nešlo použít jako indikátoru přítomnosti DNA herpetických virů. Abnormity na prvním EEG nálezu u těchto pacientů také nebyly hodnoceny jako těžké a se nejednalo o ložiskové nálezy typické pro sporadickou nekrotizující encefalitidu (*viz Tabulka 6*). Klinický průběh nemoci i rekonvalescence se nelišil vůbec. To ukazuje, že přítomnost virové DNA v MM je spíše důsledkem sekundární reaktivace virů vyvolané přítomností zánětlivých faktorů v CNS nebo přechodným oslabením imunitního dozoru nad latentní infekcí, a že nemá etiologický vztah k probíhajícímu onemocnění.

Ve studii č.2 se podařilo unikátně zachytit HSV1 DNA v MM u pacientky s lokálním výsevem herpes labialis bez morfologických známek postižení CNS typickém pro sporadickou nekrotizující encefalitidy. Pacientka byla silně imunokompromitovaná kvůli mnohočetnému myelomu ve stadiu IIIB, komplikovanému pneumokokovou purulentní meningitidou, kterou provází významná porucha hematoencefalické bariéry.

Protože je metoda PCR v současnosti hlavním diagnostickým vodítkem, mohou tyto nálezy činit diagnostické obtíže zejména při záchytech HSV1 DNA. Zde je byť i benigní průběh onemocnění absolutní indikací k zahájení terapie antivirotyky, protože onemocnění může progredovat do nekrotizující encefalitidy. Nález HHV6 DNA by se měl vždy posuzovat v souvislosti se stavem imunity pacienta včetně anamnézy a absencí jiné možné etiologie

vzhledem k risk-benefitu léčby (nefrotoxicita, myelosuprese). Zde je vhodné doplnit kontrolní lumbální punkci a potvrdit etiologii přítomnosti intrathékální syntézy specifických protilátek, zejména u imunokompromitovaných. Také je nutno zvažovat možnost integrace HHV6 do genomu v zárodečné linii, která zkresluje DNA diagnostiku a lze ji vyloučit PCR vyšetřením bezkrevné tkáně (např. nehtů nebo vlasových kořínků) (Ward K. et al., 2007).

8 Závěr

Diagnostika herpetických virů prodělává v posledních letech příklon k molekulárně biologickým metodám. Náš výzkum se soustředil na to, jakou výpovědní hodnotu má záchyt herpesvirové DNA v mozkomíšním moku. Atypické nálezy DNA herpetických virů v mozkomíšním moku souvisejí s jejich reaktivací v tomto kompartmentu. Jev není raritní a v našem souboru imunokompetentních pacientů s virovou meningitidou/meningoencefalitidou jiné než herpesvirové etiologie dosáhl 7,5 %. U pacientů s klíšťovou meningoencefalitidou se jednalo o 7 případů z 96 (7,3 %) a nejčastěji byla detekována VZV DNA, u pacientů s enterovirovou meningitidou/meningoencefalitidou u 6ti případů ze 77 (7,8 %) a nejčastěji byla detekována HHV6 DNA. Zachytili jsme i současnou přítomnost DNA dvou herpetických virů. Reaktivace nemusí zhoršovat klinický průběh onemocnění a v našem souboru byl klinický průběh onemocnění u pacientů se záchytem DNA herpetických virů i bez terapie antivirotky benigní. K reaktivaci dochází zřejmě hlavně při zánětech, což potvrzuje minimální záchyt DNA herpetických virů u pacientů bez zánětlivého cytologického nálezu v mozkomíšním moku. Naopak symptomatická reaktivace HSV1 na periférii u pacientů s purulentní meningitidou vedla k detekci HSV1 DNA v mozkomíšním moku pouze u 1 pacientky z 11 testovaných. Tato pacientka byla významně imunokompromitovaná.

Metody založené na amplifikaci nukleových kyselin jsou v současnosti hlavním diagnostickým vodítkem, proto mohou záchyty DNA herpetických virů v mozkomíšním moku činit diagnostické obtíže. Tyto výsledky je nutné vždy interpretovat s ohledem na klinický stav pacienta, epidemiologickou anamnézu a výsledky dalších vyšetření. V případně nutnosti je třeba testy opakovat s časovým odstupem k posouzení dynamiky.

9 Literatura

1. Adam, P. (1999). Likvorologie. V M. Duniewicz, P. Adam, *Neuroinfekce*, p. 21-24. Maxdorf s.r.o.
2. Agut, H., Bonnafous, P., Gautheret-Dejean, A. (2015). Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections. *Clinical microbiology reviews* Apr;28(2):313-35. doi: 10.1128
3. Anderholm, K., Bierle, C., Schleiss, M. (2016). Cytomegalovirus Vaccines: Current Status and Future Prospects. *Drugs*, 76(17), p.1625-1645.
4. Aneja, K., Yuan, Y. (2017). Reactivation and lytic replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: An update. *Frontiers in Microbiology*, 8, p.613.
5. Bale, J., Du Pasquier, R. (2015). Relapse in herpes simplex virus encephalitis: It's not just about the virus. *Neurology*, 85(20), p. 1730-1731. Lippincott Williams and Wilkins.
6. Bates, M., Monze, M., Bima, H., Kapambwe, M., Clark, D., Kasolo, F., Gompels, U. (2009). Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of sub-Saharan Africa. *Journal of Medical Virology*, 81(5), p. 779-789.
7. Bednářová, J., Štourac, P. (2009). Intratekální syntéza specifických antivirových protilátek u atakovitého a primárně chronickoprogresivního průběhu roztroušené sklerózy. *Neurologie pro Praxi*, 10(5), p.297-299.
8. Bednářová, J., Štourac, P. (2009). Intratekální syntéza specifických antivirových protilátek u atakovitého a primárně chronickoprogresivního průběhu roztroušené sklerózy. *Neurologie pro Praxi*, 10(5), p. 297-299.
9. Boivin, G. (2004). Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*, 11, p. 48A-56A.
10. Bollaerts, K., Riera-Montes, M., Heininger, U., Hens, N., Souverain, A., Verstraeten, T., Hartwig, S. (2017). A systematic review of varicella seroprevalence in European countries before universal childhood immunization: Deriving incidence from seroprevalence data. *Epidemiology and Infection*, 145(13), p. 2666-2677.

11. Bonnan, M. (2014). Does disease-irrelevant intrathecal synthesis in multiple sclerosis make sense in the light of tertiary lymphoid organs? *Frontiers in neurology*,5:27
12. Boutolleau, D., Duros, C., Bonnafous, P., Caïola, D., Karras, A., Castro, N., Gautheret-Dejean, A. (2006). Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *Journal of Clinical Virology*, 35(3), p. 257-263.
13. Breuer, J. (2003). Varicella Zoster. V B. J. Zuckerman A.J., *Principles and Practice of Clinical virology, 5th edition* , John Wiley&Sons Ltd., p. 23-69
14. Bustos, D., Biganzoli, P., Carricart, S., Ferreyra, L., Nates, S., Pavan, J. (2006). Loss of maternally-derived human herpesvirus-7 immunity and natural infection in Argentinian infants. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(5), p. 354-357.
15. Caserta, M. (2004). Human herpesvirus 6 infection of the central nervous system. *Current Infectious Disease Reports*, 6(4), p. 316-321
16. Caserta, M., McDermott, M., Dewhurst, S., Schnabel, K., Carnahan, J., Gilbert, L., Hall, C. (2004). Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *Journal of Pediatrics*, 145(4), p. 478-484.
17. Cassinotti, P., Mietz H., Siegl G. (1996). Suitability and clinical application of a multiplex nested PCR assay for the diagnosis of herpes simplex virus infections. *Journal of Medical Virology* 50 (1): p. 75-81.
18. Cavallin, L., Goldschmidt-Clermont, P., Mesri, E. (2014). Molecular and Cellular Mechanisms of KSHV Oncogenesis of Kaposi's Sarcoma Associated with HIV/AIDS. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004154.
19. Cesarman, E., Damania, B., Krown, S., Martin, J., Bower, M., Whitby, D. (2019). Kaposi sarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), p. 1-21.
20. Chan, P., Ng, H., Hui, M., Ip, M., Cheung, J., Cheng, A. (1999). Presence of human herpesviruses 6, 7, and 8 DNA sequences in normal brain tissue. *Journal of Medical Virology*, 59(4), p. 491-495.

21. Cinque, P., Bossolasco, S., Lundkvist, Å. (2003). Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *Journal of Clinical Virology*, 26(1), p.1-28.
22. Cinque, P., Brytting, M., Wahren, B., Linde, A., Cinque, P., Castagna, A., D'Arminio Monforte, A. (1993). Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *The Lancet*, 342(8868), p. 398-401.
23. Clark, D. (2004). Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes*, 11, p. 112A-119A.
24. Cohen, J. (2000). Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*, 343(7), p. 481-492.
25. Condon, L., Cederberg, L., Rabinovitch, M., Liebo, R., Go, J., Delaney, A., Balfour, H. (2014). Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among Minnesota children: Effects of race/ethnicity and family environment. *Clinical Infectious Diseases*, 59(4), p. 501-508.
26. Cunningham, A., Diefenbach, R., Miranda-Saksena, M., Bosnjak, L., Kim, M., Jones, C., Douglas, M. (2006). The cycle of human herpes simplex virus infection: Virus transport and immune control. *Journal of Infectious Diseases*. 194 Suppl 1, p. S11-18
27. Davies, N., Brown, L., Gonde, J., Irish, D., Robinson, R., Swan, A., Muir, P. (2005). Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76(1), p. 82-87.
28. De Bolle, L., Naesens, L., De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), p. 217-245.
29. DeBiasi, R., Tyler, K. (2004). Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), p. 903-925.
30. Dittmer, D., Damania, B. (2016). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: Immunobiology, oncogenesis, and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), p. 3165-3175. American Society for Clinical Investigation.

31. Donahue, J., Choo, P., Manson, J., Platt, R. (1995). The Incidence of Herpes Zoster. *Archives of Internal Medicine*, 155(15), p. 1605-1609.
32. Dowd, J., Palermo, T., Brite, J., McDade, T., Aiello, A. (2013). Seroprevalence of Epstein-Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. *PLoS ONE*, 8(5):e64921.
33. Egan, K., Wu, S., Wigdahl, B., Jennings, S. (2013). Immunological control of herpes simplex virus infections. *Journal of NeuroVirology*, 19(4), p. 328-345.
34. Ernberg, I., Andersson, J. (1986). Acyclovir efficiently inhibits oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus in patients with acute infectious mononucleosis. *Journal of General Virology*, 67; p.2267-2272.
35. Etta, E., Alayande, D., Ramarumo, L., Gachara, G., Bessong, P. (2018). HHV-8 seroprevalence and genotype distribution in Africa, 1998–2017: A systematic review. *Viruses*, 10(9):458
36. Fletcher, J., Barnett, R. (2007). Cerebrospinal Fluid and Intracranial Pressure. In: V. C. Goetz, Textbook of Clinical Neurology. 3.vyd. Saunders. P. ISBN: 9781416036180
37. Forbes, H., Williamson, E., Benjamin, L., Breuer, J., Brown, M., Langan, S., Warren-Gash, C. (2018). Association of herpesviruses and stroke: Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 13(11):e0206163.
38. Fourcade, G., Germi, R., Guerber, F., Lupo, J., Baccard, M., Seigneurin, A., Epaulard, O. (2017). Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. *PLoS ONE*, 12(4):e0175574.
39. Gershon, A., Breuer, J., Cohen, J., Cohrs, R., Gershon, M., Gilden, D., Yamanishi, K. (2015). Varicella zoster virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 1:p. 15016.
40. Ghose, C., Ly, M., Schwanemann, L., Shin, J., Atab, K., Barr, J., Pride, D. (2019). The Virome of Cerebrospinal Fluid: Viruses Where We Once Thought There Were None. *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 2061.

41. Gildea, D., Cohrs, R., Mahalingam, R., Nagel, M. (2009). Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *The Lancet Neurology*, 8(8), p. 731-740.
42. Griffiths, P. (2009). Cytomegalovirus. In: P. Griffiths, *Principles and Practice of Clinical Virology*. 6. vyd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., p. 161-197. ISBN:9780470741405
43. Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M. (2015). The pathogenesis of human cytomegalovirus. *Journal of Pathology*, 235(2), p. 288-297.
44. Hall, C., Caserta, M., Schnabel, K., McDermott, M., Lofthus, G., Carnahan, J., Dewhurst, S. (2006). Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV)-7 infections in relation to infection with HHV-6. *Journal of Infectious Diseases*, 193(8), p. 1063-1069.
45. Hatton, O., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S., Martinez, O. (2014). The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: Implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic Research*, 58(2-3), p. 268-276.
46. Hollier, L., Wendel, G. (2008). Third trimester antiviral prophylaxis for preventing maternal genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and neonatal infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews(1):CD004946*.
47. Holub, M., Arientová, S., Rozsypal, H., Labská, K., Mašata, J., Kacerovský, M., Zach, J. (2019). *Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu genitálního herpesu u žen*. [online]. Společnost infekčního lékařství ČLS JEP. [cit. 2020-09-07]. Dostupný z WWW: <<https://www.infekce.cz/Herpesgen/DP-HSV-2-19p.pdf>>
48. Hope-Simpson, R. (1965). The Nature of Herpes Zoster: A Long-Term Study and a New Hypothesis. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 58(1), p. 9-20.
49. Hubáček, P., Hrdličková, A., Špaček, M., Zajac, M., Mužíková, K., Sedláček, P., Cetkovský, P. (2013). Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic. *Folia Microbiologica*, 58(1), p.87-90.

50. Hubáček, P., Mužíková, K., Hrdličková, A., Cinek, O., Hynčicová, K., Hrstková, H., Starý, J. (2009). Prevalence of HHV-6 integrated chromosomally among children treated for acute lymphoblastic or myeloid leukemia in the Czech Republic. *Journal of Medical Virology*, 81(2), p.258-263.
51. Ihira, M., Yoshikawa, T., Suzuki, K., Ohashi, M., Suga, S., Asonuma, K., Asano, Y. (2001). Correlation between Human Herpesvirus 6 and 7 Infections after Living Related Liver Transplantation. *Microbiology and Immunology*, 45(3), p. 225-232.
52. James, C., Harfouche, M., Welton, N., Turner, K., Abu-Raddad, L., Gottlieb, S., Looker, K. (2020). Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, 98(5), p. 315-329.
53. Jarius, S., Eichhorn, P., Franciotta, D., Petereit, H., Akman-Demir, G., Wick, M., Wildemann, B. (2017). The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *Journal of Neurology*, 264(3), p. 453-466.
54. Johnston, C., Corey, L. (2015). Current concepts for genital herpes simplex virus infection: Diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(1), p. 149-161.
55. Kempkes, B., Robertson, E. (2015). Epstein-Barr virus latency: Current and future perspectives. *Current Opinion in Virology*, 14, p. 138-144.
56. Kimberlin, D. (2004). Neonatal Herpes Simplex Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), p.1-13.
57. Koelle, D., Wald, A. (2000). Herpes simplex virus: The importance of asymptomatic shedding. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45, p. 1-8.
58. Koning, M., Brik, T., Hagenbeek, R., van den Wijngaard, I. (2019). A case of fulminant Epstein-Barr virus encephalitis in an immune-competent adult. *Journal of NeuroVirology*, 25(3), p. 422-425.
59. Krause, P., Bialek, S., Boppana, S., Griffiths, P., Laughlin, C., Ljungman, P., Plotkin, S. (2013). Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine*, 32(1), p. 4-10.

60. Krbková, L., Holečková, K., Blechová, Z., Marešová, V., Labská, K., Štroblová, H., Bednářová, J. (2014). Nálezy v mozkomíšním moku u dětí s akutním paretickým postižením. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie*, 77(4), p. 496-500.
61. Kukhanova, M., Korovina, A., Kochetkov, S. (2014). Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), p. 1635-1652.
62. Kuri, A., Jacobs, B., Jacobs, B., Vickaryous, N., Pakpoor, J., Middeldorp, J., Dobson, R. (2020). Epidemiology of Epstein-Barr virus infection and infectious mononucleosis in the United Kingdom. *BMC Public Health*, 20(1):912.
63. Labská, K., Roubalová, K., Pícha, D., Marešová, V. (2015). Presence of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis and enteroviral meningoencephalitis. *Journal of Medical Virology*, 87(7), p.1235-1240.
64. Lau, J., Low, Z., Abbott, I., Shochet, L., Kanellis, J., Kitching, A., Korman, T. (2017). Epstein-Barr virus encephalitis in solid organ transplantation. *New Microbiologica*, 40(3), p. 212-217.
65. Levin, M. (2014). Varicella-zoster virus and virus DNA in the blood and oropharynx of people with latent or active varicella-zoster virus infections. *Journal of Clinical Virology*, 61(4), p. 487-495.
66. Liedtke, W., Opalka, B., Zimmermann, C., Lignitz, E. (1993). Age distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus genome in human nervous tissue. *Journal of the Neurological Sciences*, 116(1), p. 6-11.
67. Liu, Z., Fang, Q., Zuo, J., Wang, J., Chen, Y., Minhas, V., Zhang, T. (2017). High seroprevalence of human herpesvirus 8 and herpes simplex virus 2 infections in men who have sex with men in Shanghai, China. *Journal of Medical Virology*, 89(5), p. 887-894.
68. Longnecker, R., Neipel, F. (2007). Introduction to the human γ -herpesviruses. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., Longnecker R., Neipel F., *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 1 vyd. Cambridge University Press. p. 341-359. ISBN: 9780511286896

69. Mainka, C., Fuß, B., Geiger, H., Höfelmayr, H., Wolff, M. (1998). Characterization of viremia at different stages of Varicella-zoster virus infection. *Journal of Medical Virology*, 56(1), p. 91-98.
70. Marešová, V., Malý, M., Kynčl, J., Bronská, E., Beneš, Č., Novák, I., Táborská, J. (2006). Varicella and its complications: A five-year retrospective analysis of hospitalized patients. *Antibiotiques*, 8(3), p. 131-135.
71. Martró, E., Esteve, A., Schulz, T., Sheldon, J., Gambús, G., Muñoz, R., Casabona, J. (2006). Risk factors for human Herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicentre study. *International Journal of Cancer*, 120(5), p. 1129-1135.
72. Mejías, A., Bustos, R., Ardura, M., Ramírez, C., Sánchez, P. (2009). Persistence of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of neonates with herpes simplex virus encephalitis. *Journal of Perinatology*, 29(4), p. 290-296.
73. Mészner, Z., Wysocki, J., Richter, D., Zavadská, D., Ivaskeviciene, I., Usonis, V., Wolfson, L. (2019). Burden of varicella in Central and Eastern Europe: findings from a systematic literature review. *Expert Review of Vaccines*, 18(3), p. 281-293.
74. Moffat, J., Ku, C., Zerboni, L., Sommer, M., Arvin, A. (2007). VZV: Pathogenesis and the disease consequences of primary infection. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., Longnecker R., Neipel F., *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 1 vyd. Cambridge University Press. p. 675-688. ISBN: 9780511286896.
75. Moore, P. (2000). The emergence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (Human Herpesvirus 8). *New England Journal of Medicine*, 343(19), p. 1411-1413.
76. Morrison, V., Johnson, G., Schmader, K., Levin, M., Zhang, J., Looney, D., Toney, J. (2015). Long-term persistence of zoster vaccine efficacy. *Clinical Infectious Diseases*, 60(6), p. 900-909.
77. Nagel, M., Gilden, D. (2014). Neurological complications of varicella zoster virus reactivation. *Current Opinion in Neurology*, 27(3), p. 356-360.

78. Nagel, M., Gilden, D. (2015). The Relationship Between Herpes Zoster and Stroke. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 15(4), p. 16
79. Navti, O., Hughes, B., Tang, J., Konje, J. (2016). Comprehensive review and update of cytomegalovirus infection in pregnancy. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 18(4), p.301-307.
80. Němečková, Š., Roubalová, K. (2019). Antiviral adoptive immunotherapy using antigen-specific T cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 68(3), p. 144-148.
81. Ongrádi, J., Ablashi, D., Yoshikawa, T., Stercz, B., Ogata, M. (2017). Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of NeuroVirology*, 23(1), p. 1-19.
82. O'Sullivan, C., Aksamit, A., Harrington, J., Harmsen, W., Mitchell, P., Patel, R. (2003). Clinical Spectrum and Laboratory Characteristics Associated With Detection of Herpes Simplex Virus DNA in Cerebrospinal Fluid. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(11), p. 1347-1352.
83. Otto, W., Myers, A., Larussa, B., Kimberlin, D., Jackson, M. (2016). Clinical and Laboratory Markers and Risk for Cerebrospinal Fluid Herpes Simplex Virus (HSV) Deoxyribonucleic Acid Persistence HSV in Neonatal Disseminated and Central Nervous System Infection. *Open Forum Infectious Diseases*, 3 (suppl_1).
84. Oxman, M. (2010). Zoster vaccine: Current status and future prospects. *Clinical Infectious Diseases*, 51(2), p. 197-213.
85. Oxman, M., Levin, M., Johnson, G., Schmader, K., Straus, S., Gelb, L., Silber, J. (2005). A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *New England Journal of Medicine*, 352(22), p. 2271-2284.
86. Pagano, J., Whitehurst, Christopher B., Andrei, G. (2018). Antiviral drugs for EBV. *Cancers (Basel)*, 10(6): 197.

87. Pebody, R., Andrews, N., Brown, D., Gopal, R., De Melker, H., François, G., Vrancky, R. (2004). The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sexually Transmitted Infections*, 80(3), p.185-191.
88. Pellett, P., Ablashi, D., Ambros, P., Agut, H., Caserta, M., Descamps, V., Razonable, R. (2012). Chromosomally integrated human herpesvirus 6: Questions and answers. *Reviews in Medical Virology*, 22(3), p. 144-155.
89. Persson, A., Bergström, T., Lindh, M., Namvar, L., Studahl, M. (2009). Varicella-zoster virus CNS disease-Viral load, clinical manifestations and sequels. *Journal of Clinical Virology*, 46(3), p. 249-253.
90. Quinlivan, M., Breuer, J., Schmid, D. (2011). Molecular studies of the Oka varicella vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 10(9), p. 1321-1336.
91. Rajčáni, J., Ďurmanová, V. (2006). Developments in herpes simplex virus vaccines: Old problems and new challenges. *Folia Microbiologica*, 51(2), p. 67-85.
92. Ramirez KA, C. A. (2018). Comparing molecular quantification of herpes simplex virus (HSV) in cerebrospinal fluid (CSF) with quantitative structural and functional disease severity in patients with HSV encephalitis (HSVE): Implications for improved therapeutic approaches. *Journal of clinical virology*, 107, p. 29-37.
93. Raschilas, F., Wolff, M., Delatour, F., Chaffaut, C., De Broucker, T., Chevret, S., Coudray, C. (2002). Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: Results of a multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*, 35(3), p. 254-260.
94. Reiber, H. (1994). Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – A concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 122(2), p. 189-203.
95. Reiber, H., Ungefehr, S., Jacobi, C. (1998). The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 4(3), p. 111-117.
96. Rieder, F., Steininger, C. (2014). Cytomegalovirus vaccine: Phase II clinical trial results. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(S5), p. 95-102..

97. Rohner, E., Wyss, N., Trelle, S., Mbulaiteye, S., Egger, M., Novak, U., Bohlius, J. (2014). HHV-8 seroprevalence: a global view. *Systematic reviews*, 3,11.
98. Roubalová, K., Seeman, J. (1998). Sérologický přehled protilátek proti herpetickým virům, CMV, EBV, VZV. *Zprávy CEM*, 7 (příl. 1), p. 29-31.
99. Roubalová, K., Suchánková, A., Bojar, M., Glosová, L., Machová, H., Šoltysová, K. (2007). Průkaz aktivní infekce virem varicella zoster (VZV) u pacientů s neurologickými komplikacemi. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*, 13(3), p. 109-114.
100. Schloss, L., Falk, K., Skoog, E., Brytting, M., Linde, A., Aurelius, E. (2009). Monitoring of herpes simplex virus DNA types 1 and 2 viral load in cerebrospinal fluid by real-time PCR in patients with herpes simplex encephalitis. *Journal of Medical Virology*, 81(8), p.1432-1437.
101. Schulte, J., Bellamy, A., Hook, E., Bernstein, D., Levin, M., Leone, P., Belshe, R. (2014). HSV-1 and HSV-2 seroprevalence in the united states among asymptomatic women unaware of any herpes simplex virus infection (herpevac trial for women). *Southern Medical Journal*, 107(2), p. 79-84.
102. Sedláček, D., Petroušová, K., Labská, K. (2020). Doporučený postup prevence a léčby onemocnění vyvolaných virem varicely a zosteru (VZV) u osob s imunodeficitou.[online]. Společnost infekčního lékařství ČLS JEP. [cit. 2020-09-07]. Dostupný z WWW: <<https://www.infekce.cz/DPVZV-IDS-20.htm>>
103. Sigfrid, L., Perfect, C., Rojek, A., Longuere, K., Lipworth, S., Harriss, E., Horby, P. (2019). A systematic review of clinical guidelines on the management of acute, community-acquired CNS infections. *BMC medicine*, 17(1), p. 170.
104. Simko, J., Caliendo, A., Hogle, K., Versalovic, J. (2002). Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex vires (HSV) documented by detection of HSV DNA. *Clinical Infectious Diseases*, 35(4), p. 414-419.

105. Smith, C., Khanna, R. (2013). Immune Regulation of Human Herpesviruses and Its Implications for Human Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13(s3), p. 9-23.
106. Šoltysová, K., Bronská, E., Pícha, D., Marešová, V. (2005). Herpes simplex virus – causative agent, or innocent bystander? *Clinical Microbiology and Infection* 11, Supplement 2., p. 502.
107. Steininger, C., Popow-Kraupp, T., Seiser, A., Gueler, N., Stanek, G., Puchhammer, E. (2004). Presence of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid of patients with guillain-barré syndrome. *Journal of Infectious Diseases*, 189(6), p. 984-989.
108. Strenger, V., Caselli, E., Lautenschlager, I., Schwinger, W., Aberle, S., Loginov, R., Urban, C. (2014). Detection of HHV-6-specific mRNA and antigens in PBMCs of individuals with chromosomally integrated HHV-6 (ciHHV-6). *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), p. 1027-1032.
109. Suchánková, A., Staňková, M., Roubalová, K., Vandasová, J., Brůčková, M. (2003). Seroprevalence of HHV 8 antibodies among the general population and HIV positive persons in the Czech Republic. *Journal of Clinical Virology*, 28(1), p.70-76.
110. Sundström, K., Weibull, C., Söderberg-Löfdal, K., Bergström, T., Sparén, P., Arnheim-Dahlström, L. (2015). Incidence of herpes zoster and associated events including stroke-a population-based cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), p. 488.
111. Suzich, J., Cliffe, A. (2018). Strength in diversity: Understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. *Virology*, 522, p. 81-91.
112. Tanaka-Taya, K., Kondo, T., Mukai, T., Miyoshi, H., Yamamoto, Y., Okada, S., Yamanishi, K. (1996). Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*, 48(1), p. 88-94.
113. Tanaka-Taya, K., Sashihara, J., Kurahashi, H., Amo, K., Miyagawa, H., Kondo, K., Yamanishi, K. (2004). Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child

in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical Virology*, 73(3), p. 465-473.

114. Tang, Y., Hibbs, J., Tau, K., Qian, Q., Skarhus, H., Smith, T., Persing, D. (1999). Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), p. 803-806.
115. Tang, Y., Mitchell, P., Espy, M., Smith, T., Persing, D. (1999). Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), p. 2127-2136.
116. Theil, D., Horn, A., Derfuss, T., Strupp, M., Arbusow, V., Brandt, T. (2004). Prevalence and distribution of HSV-1, VZV, and HHV-6 in human cranial nerve nuclei III, IV, VI, VII, and XII. *Journal of Medical Virology*, 74(1), p. 102-106.
117. Tuokko, H., Bloigu, R., Hukkanen, V. (2014). Herpes simplex virus type 1 genital herpes in young women: Current trend in Northern Finland. *Sexually Transmitted Infections*, 90(2), p. 160.
118. Tyler, K. (2004). Herpes simplex virus infections of the central nervous system: Encephalitis and meningitis, Including mollaret's. *Herpes*, 11. Suppl 2, p. 57A-64A.
119. Voigt, S., Rosario, A., Mankertz, A. (2016). Cytomegalovirus seroprevalence among children and adolescents in Germany: Data from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS), 2003-2006. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(1), p. 193
120. Wald, A. (2004). Herpes simplex virus type 2 transmission: Risk factors and virus shedding. *Herpes*, 11, p. 130A-137A.
121. Ward, K., Clark, D. (2009). Roseoloviruses: Human Herpesviruses 6A, 6B and 7. V K. Ward, D. Clark, In: P. Griffiths, *Principles and Practice of Clinical Virology*. 6. vyd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., p. 223-244. ISBN:9780470741405
122. Ward, K., Couto Parada, X., Passas, J., Thiruchelvam, A. (2002). Evaluation of the specificity and sensitivity of indirect immunofluorescence tests for IgG to human herpesviruses-6 and -7. *Journal of Virological Methods*, 106(1), p.107-113.

123. Ward, K., Hoe, N., Thiruchelvam, A., Atkinson, C., Clark, D. (2007). Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), p. 1298-1304.
124. Whitley, R. (2015). Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, 21(6), p. 1704-1713.
125. Whitley R, Kimberlin DW, Prober CG. *Pathogenesis and disease*. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K., Longnecker R., Neipel F., *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 1 vyd. Cambridge University Press. p.. ISBN: 9780511286896
126. Wolfson, L., Daniels, V., Altland, A., Black, W., Huang, W., Ou, W. (2020). The Impact of Varicella Vaccination on the Incidence of Varicella and Herpes Zoster in the United States: Updated Evidence from Observational Databases, 1991-2016. *Clinical Infectious Diseases*. 70, p. 995-1002.
127. Xu, X., Zhang, Y., Li, Q. (2019). Characteristics of herpes simplex virus infection and pathogenesis suggest a strategy for vaccine development. *Reviews in Medical Virology*, 29(4). e2054
128. Yamanishi, K., Kondo, K., Nagafuji, H., Hata, A., Tomomori, C. (1993). Association of Human Herpesvirus 6 Infection of the Central Nervous System with Recurrence of Febrile Convulsions. *Journal of Infectious Diseases*, 167(5), p.1197-1200.
129. Zerboni, L., Arvin, A. (2015). Neuronal Subtype and Satellite Cell Tropism Are Determinants of Varicella-Zoster Virus Virulence in Human Dorsal Root Ganglia Xenografts In Vivo. *PLoS Pathogens*, 11(6). e1004989
130. Zerboni, L., Sen, N., Oliver, S., Arvin, A. (3 2014). Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), p. 197-210.
131. Zerr, D. (2006). Human herpesvirus 6 and central nervous system disease in hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 37 Suppl 1. p.S52-56

132. Zhang, J., Liu, H., Wei, B. (2017). Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 18(4), p. 277-288.
133. Zimmerli, S. (nedatováno). [online] [cit. 2020-08-07], Dostupný z WWW: <https://www.researchgate.net/profile/Simone_Zimmerli2/publication/33682737/figure/fig13/AS:655100875919362@1533199628236/Life-cycle-of-herpes-viruses-1-Herpes-entry-by-attachment-and-penetration-2-Release_W640.jpg>
134. Zmasek, C., Knipe, D., Pellett, P., Scheuermann, R. (2019). Classification of human Herpesviridae proteins using Domain-architecture Aware Inference of Orthologs (DAIO). *Virology*, 529, p. 29-42.
135. Zuhair, M., Smit, G., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleesschauwer, B., Griffiths, P. (2019). Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 29(3). e2034