

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DIZERTAČNÍ PRÁCE

2016 MUDr. Lenka Petroušová

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: preventivní medicína



MUDr. Lenka Petroušová

Význam molekulárně genetických metod v diagnostice neuroinfekcí

The role of molecular genetics methods in diagnostics of neuroinfections

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc.

Konzultant: Doc. MUDr. Dušan Pícha, CSc.

Praha 2016

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, dne 10. 1. 2016

MUDr. Lenka Petroušová

Poděkování:

Mým školitelům doc. Marešové bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc, důsledné vedení a přátelský přístup, ochotu a trpělivost v průběhu celého postgraduálního studia, Doc. Píchovi za konzultace při dokončení práce. Mgr. Mrázkovi za konzultace při vyšetřování materiálu. Doc. Rožnovskému za vedení v profesním životě.

Identifikační záznam:

PETROUŠOVÁ, Lenka. *Význam molekulárně genetických metod v diagnostice neuroinfekcí.* [The role of molecular genetics methods in diagnostics of neuroinfections]. Praha, 2016. 72 s., 8 příl. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Preventivní medicína. Školitel Marešová, Vilma.

Obsah

1. Molekulární metody v diagnostice neuroinfekcí	9
1.1. Úvod.....	9
1.2. Molekulárně genetické metody	10
1.3. Využití molekulárních genetických metod v diagnostice infekčních onemocnění.....	11
2. Purulentní meningitidy	12
2.1. Pneumokokové meningitidy.....	12
2.2. Listeriové meningitidy	13
2.3. Hemofilové meningitidy	13
2.4. Meningokokové meningitidy	14
2.5. Meningitidy způsobené dalšími patogeny.....	15
2.5.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
2.5.2. Viridující streptokokoky	15
2.5.3. Stafylokokové meningitidy	16
2.5.4. Gramnegativní bakterie	16
2.5.5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
3. Aseptické neuroinfekce	17
3.1. Enteroviry.....	17
3.2. Herpetické viry.....	18
3.3. Arboviry	19
3.4. Příušnice.....	19
3.5. Chřipka.....	20
3.6. Hepatitida E.....	20
3.7. Lymeská borrelióza	21
4. Cíle práce	22

5. Materiál a metody	23
5.1. Purulentní meningitidy	23
5.2. Aseptické neuroinfekce	24
5.3. Statistické metody	25
6. Výsledky	26
6.1. Purulentní meningitidy	26
6.1.1. Pneumokokové meningitidy.....	30
6.1.2. Meningokokové meningitidy	32
6.1.3. Hemofilové meningitidy	34
6.1.4. Listeriové meningitidy	36
6.1.5. Porovnání přínosu PCR a kultivace v diagnostice purulentních meningitid.....	38
6.2. Aseptické neuroinfekce	40
6.2.1. Enteroviry.....	42
6.2.2. Herpetické infekce.....	43
6.2.3. Chřipka	45
6.2.4. Hepatitida E.....	45
6.2.5. Epidemická parotitida	46
6.2.6. Lymeská borrelióza	46
6.2.7. Neurčený virus	47
6.2.8. Další infekce.....	47
6.2.9. Klíšťová encefalitida	47
6.2.10. Porovnání přínosu jednotlivých metod v diagnostice aseptických neuroinfekcí ..	48
7. Diskuze	51
7.1. Purulentní meningitidy.....	51
7.2. Aseptické meningitidy.....	56

8. Závěr	62
9. Souhrn	63
10. Summary	64
11. Seznam zkratk	65
12. Literatura	66
13. Přílohy	73
13.1. Seznam publikací, abstrakt, přednášek	73
13.1.1. Publikace s IF k tématu dizertace	73
13.1.2. Publikace bez IF k tématu dizertace	73
13.1.3. Publikace s IF bez vztahu k dizertaci	74
13.1.4. Publikace bez IF bez vztahu k dizertaci	74
13.1.5. Přednášky s abstraktem	75
13.1.6. Poster s abstraktem	78
13.1.7. Přednášky bez abstrakt	78
13.1.8. Spoluautor knihy	81
13.2. Grant	81
13.3. Článek: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie	82
13.4. Článek: Clinical microbiology and infection	83
13.5. Článek: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie	84
13.6. Článek: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie	85
13.7. Článek: Vakcinologie.....	86
13.8. Poster: Covac Munich.....	87

1 MOLEKULÁRNÍ METODY V DIAGNOSTICE NEUROINFEKČÍ

1.1. ÚVOD

Neuroinfekce mají velkou šíři klinických příznaků, zahrnují život ohrožující purulentní meningitidy a meningoencefalitidy, ale také i relativně mírně probíhající aseptické meningitidy. Včasná diagnostika a adekvátní terapie je pro pacienta enormně důležitá. Prvním rozhodujícím krokem je posouzení klinického stavu pacienta v korelaci s likvorovým nálezem (*Beneš J., 2009*). Rychlá diagnostika původce neuroinfekce umožňuje cílenou léčbu, její úpravu, včetně deeskalace úvodní rozsáhlejší léčby (*Favaro M. et al., 2013*). Iniciální léčba, která musí být zahájena neodkladně, může zejména u imunosuprimovaných pacientů zahrnovat antibiotickou, protivirovou i antimykotickou terapii. Diagnostikovat původce má význam i z epidemiologického hlediska. U preventabilních chorob je důležité sledovat efekt vakcinace v populaci, případně na základě epidemiologických údajů je možné zvažovat rozšíření vakcinace nebo lépe definovat rizikové skupiny pro onemocnění.

Klasické metody průkazu původce: kultivace, mikroskopie a latex aglutinace umožní přímou diagnostiku, ale jsou méně citlivé a u kultivace přistupuje navíc časová prodleva k získání výsledků a nemožnost vyšetření byla-li již zahájena antibiotická léčba. Nespornou výhodou kultivace zůstává možnost stanovení citlivosti původce na antibiotika. Molekulární metody, zejména polymerázová řetězová reakce (PCR), vstoupily do rutinní diagnostiky neuroinfekcí v posledních 2 dekadách. Tyto metody umožní přímý průkaz původce, jejich hlavní výhodou je rychlost, specifita a vysoká citlivost, mnohdy i u pacientů s dříve zahájenou antibiotickou léčbou (*Mackay IM., 2004; Hrabák J. et al., 2010; Harrison OB. et al., 2011; Van Gastel E. et al. 2007*). Nevýhodou je pouze cílená identifikace menšího spektra původců, v běžné praxi nemožnost stanovit citlivost původců na antibiotika a určitá možnost falešně pozitivních výsledků, vzhledem k vysoké citlivosti je schopna zjistit i tzv. nepatogenní koncentraci mikroba v biologickém materiálu (*Favaro M. et al, 2013; Mackay IM., 2004*).

Sérologické metody patří mezi nepřímou diagnostiku, často je nutné k vyšetření odebírat párové séra s časovým rozestupem 10 – 14 dnů. Výsledek bývá v praxi k dispozici relativně pozdě, proto mají spíše epidemiologický význam.

1.2. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY

Diagnostické metody založené na molekulárně genetických metodách zahrnují průkaz specifického úseku nukleové kyseliny, který je pro hledaného mikroba zcela typický. K průkazu původců slouží krátká synteticky připravená jednořetězcová komplementární nukleová kyselina (NK). Na tuto uměle připravenou diagnostickou NK, která obsahuje zrcadlově uspořádané baze, se váže hledaný úsek původce prostřednictvím vodíkových můstků, což se nazývá hybridizace (*Bednář M., 1997*). Molekulárně genetické metody se zjednodušeně rozdělují na 2 základní skupiny: metody bez amplifikace pouze s hybridizací, a metody s hybridizací a následnou amplifikací. V klinické praxi se nejčastěji používá metoda s amplifikací – polymerázová řetězová reakce. Množství DNA potřebné pro PCR je velice malé, udává se mezi 1-500 ng, až její namnožení umožňuje její detekci, což vysvětluje vysokou citlivost PCR metody (*Mackay IM., 2004; Bednář M., 1997*). Významnou inhibici PCR způsobují erythrocyty, například primárně hemolyzovaná krev. Pro průkaz RNA virů se používá reversně transkripční PCR. Pro současnou detekci více mikroorganismů se používá technika multiplex PCR. Pro určení množství původců je používána technika kvantitativní PCR. Je známo, kolik molekul referenční DNA bylo na začátku reakce, výsledek se získá porovnáním obou DNA pomocí extinkce a výpočtem.

V dnešní době se již běžně používají techniky „real-time“ PCR, které se vyznačují vyšší rychlostí, přesnější kvantifikací, menším rizikem kontaminace a nižší pracností. Integrují v automatizovaném termocykleru do jednoho homogenního systému amplifikaci a detekci. Už v průběhu PCR reakce dochází k průběžnému měření (např. fluorescencí) a vyhodnocování signálu (*Mackay IM., 2004; Bednář M., 1997*).

Falešně pozitivní výsledky jsou známým nebezpečím při PCR reakci. Dochází k nim tak, že materiál je kontaminován amplikony, které se dostaly do vzduchu a následně do vzorku během pipetování jiného, již amplifikovaného vzorku. K falešně pozitivnímu výsledku stačí vzhledem k vysoké citlivosti metody zcela nepatrná příměs (*Mackay IM., 2004; Bednář M., 1997*).

1.3. VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH GENETICKÝCH METOD V DIAGNOSTICE INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Molekulární biologické metody nacházejí stále větší uplatnění v diagnostice infekčních nemocí. Největší uplatnění dosahují metody amplifikační, především PCR. Lze to přisoudit postupující standardizaci a dostupnosti metody a z toho vyplývající možnosti zlepšit diagnostiku a následnou léčbu pacienta. Tyto metody jsou kultivačně nezávislé, vynikají rychlostí, specificitou a vysokou citlivostí (*Hrabák J. et al., 2010*).

Přínos PCR oceňujeme hlavně tam, kde dosavadní klasické metody selhávají nebo jsou příliš zdlouhavé. V klinické praxi je hlavní přínos při diagnostice:

- virových hepatitid B a C včetně kvantifikace virové nálože,
- HIV infekce (kvantifikace, rezistence, posouzení terapie),
- herpetických infekcí,
- cytomegalové (CMV) infekce a její kvantifikace zejména u imunosuprimovaných,
- mykobakteriálních infekcí,
- chlamydiových infekcí,
- pneumocystové infekce (sputum, bronchoalveolární laváž),
- toxoplasmózy z plodové vody, likvoru,
- Lymeské borreliózy,
- bakteriální meningitidy meningokokové, pneumokokové, streptokokové, hemofilové a listeriové,
- ehrlichiozy,
- pertuse a parapertuse.

Metoda PCR však není kultivační metodou a neumožňuje tedy s kultivací srovnatelnou analýzu antibiotické rezistence bakterií a kvasinek. Ve srovnání s kultivačními metodami jsou PCR metody dražší. PCR diagnostika se užívá k cílené diagnostice jak v primárně sterilních materiálech (likvor, tkáň, implantáty), tak i v nesterilních materiálech k detekci obtížně kultivovatelných původců, např. chlamydií v uretrálním traktu či mykobakterií a bordetel ve sputu. V případě neuroinfekcí se využívá i výhoda potřeby jen malého množství materiálu k diagnostice, protože likvor je obtížně odebratelný materiál a často jeho nedostatek byl limitací provedení nutných vyšetření.

2 PURULENTNÍ MENINGITIDY

Purulentní meningitida je vždy akutní život ohrožující onemocnění. V klinickém obrazu dominuje různý stupeň poruchy vědomí spojený se septickým stavem. V likvorovém nálezu je typická pleiocytóza s převahou neutrofilů, vysoká hladina bílkoviny a laktátu a nízká hladina cukru. Vyšetřením krve se prokáže elevace zánětlivých parametrů (Duniewicz M. et al, 1999).

Purulentní meningitidou jsou ohroženy všechny věkové kategorie. I když onemocnění jednotlivými patogeny jsou typická pro určitý věk nebo predisponující faktory. Nejčastějšími původci jsou *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* typ b, *Neisseria meningitidis*, a *Listeria monocytogenes*. Uplatnit se může *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, gramnegativní bakterie nebo enterokoky zvláště u osob s oslabenou imunitou nebo zavedeným shuntem (Beneš J. 2009). U osob s výrazně oslabenou imunitou je nutné zvažovat i mykotickou etiologii hlavně *Cryptococcus neoformans*. *Mycobacterium tuberculosis* je v našich podmínkách vzácným původcem bakteriální meningitidy. Teoreticky onemocnění může způsobit jakýkoliv mikrob, vždy v závislosti na patogenitě původce a obranných schopnostech organismu.

Včasná diagnostika a včasné zahájená terapie má vliv na prognózu onemocnění, optimální interval zahájení cílené terapie je do 30 minut (Rožnovský L. et al, 2013).

2.1. PNEUMOKOKOVÉ MENINGITIDY

Streptococcus pneumoniae je nejčastějším původcem purulentní meningitidy, způsobuje meningitidy až u 28–58 % všech pacientů s purulentní meningitidou (Džupová O. et al., 2009; van de Beek D. et al., 2004). V České republice čtvrtinu všech invazivních pneumokokových onemocnění (IPO) tvoří meningitida (Kozáková J. et al., 2014). IPO má typickou věkovou distribuci, vyšší výskyt onemocnění je u dětí do 5 let věku, stoupá u osob starších 50 let a nejvyšší je u osob starších 65 let (Chlíbek R. et al., 2014). V České republice v roce 2013 a 2014 byla nejvyšší incidence všech IPO ve věkové skupině nad 65 let, dosahovala 10,2/100 000, resp. 8,2/100 000 obyvatel. Jedná se o preventabilní onemocnění, k dispozici je 23valentní polysacharidová vakcína a 2 konjugované vakcíny, 10valentní a 13 valentní.

Vakcinace je prevence IPO a ovlivňuje i nasofaryngeální nosičství invazivních sérotypů pneumokoka.

Před zahájením vakcinace konjugovanými vakcínami nejrizikovější skupinu pro rozvoj meningitidy představovaly děti do 1 roku, věkově specifická nemocnost v této věkové skupině v roce 2008 byla 11,4/100000, vlivem vakcinace došlo v roce 2012 k výraznému poklesu na 1,8/100000. V důsledku poklesu proočkovanosti došlo znovu k vzestupu na 6,5/100 000 v roce 2014 (*Kozáková J. et al., 2014*). Vakcinace v naší republice dosud neovlivnila četnost výskytu IPO ani pneumokokových meningitid u dospělých (*Kozáková J. et al., 2014*). Přitom v USA došlo v důsledku vakcinace k poklesu incidence onemocnění u dětí o 75 %, v souvislosti s navozením kolektivní imunity se snížila i incidence u dospělých o 31 % (*Thigpen MC. et al., 2011*).

2.2. LISTERIOVÉ MENINGITIDY

Infekce CNS je poměrně častým projevem listeriózy. Probíhá spíše jako subakutní meningitida, typické je postižení novorozenců a osob s výraznou imunosupresí například po onkologické léčbě nebo osob ve stadiu AIDS, v souboru pražských autorů až 61 % osob dosahoval určitého stupně imunosuprese (*Džupová O. et al., 2013*). V ČR dle údajů z Epidatu je ročně hlášeno 30 - 70 onemocnění. Letalita listeriovým meningitid se pohybuje kolem 13 % v souboru pražských autorů, ale je udávána ve velmi širokém rozmezí 16 – 76 % (*Džupová O. et al., 2013*). Časně nasazená léčba má zásadní vliv na prognózu pacienta. Lékem volby jsou aminopeniciliny (*Džupová O. et al., 2013*). Kultivace mikroba znamená několik dní zpoždění za správnou diagnózou a tudíž i za správnou terapií, která má zásadní vliv na vývoj onemocnění a vznik následných komplikací. Prevencí je poučení imunosuprimovaných osob a těhotných žen o správných stravovacích zvyklostech, hlavně konzumace dostatečně tepelně upraveného jídla a vynechání z jídelníčku zrajících sýrů.

2.3. HEMOFILOVÉ MENINGITIDY

Meningitida a epiglottitida patřila před vakcinací mezi nejčastější projevy invazivního onemocnění způsobené *Haemophilus influenzae* typu b dětí do 5 let. Hemofilové infekce

jiných sérotypů se uplatňují obvykle u imunosuprimovaných osob (Beneš J., 2015). Před zavedením rutinní vakcinace konjugovanou vakcínou byl hemofilus nejčastějším původcem meningitid v USA, neboť vyvolával až 48 % meningitid (Schlech WF. et al., 1985). Po zavedení rutinní vakcinace v roce 1991 došlo v USA do roku 1996 k poklesu incidence o 94 % (Schlech WF. et al. 1985). Stejný trend lze pozorovat i v ČR, i když o 10 let později, protože rutinní vakcinace byla zahájena v červenci 2001. Pokles nemocnosti byl pozorován již v roce 2002 a příznivý trend trvá nadále. Zavedením plošné vakcinace došlo v České republice k výraznému poklesu incidence onemocnění z 1,2/100 000 na 0,1/100 000. V roce 2012 bylo hlášeno 11 případů onemocnění, převažovaly meningitida a sepse, ani jedno onemocnění nebylo způsobeno vakcinačním kmenem (Lebedová V. et al., 2013). V letech 2009 – 2013 bylo ve všech věkových kategoriích zaznamenáno jen 5 invazivních onemocnění způsobených sérotypem b (Lebedová V. et al., 2014). Navíc v případě vakcinace proti hemofilovým onemocněním klesá i nasofaryngeální nosičství invazivních kmenů, což má pozitivní dopad na nenaočkované jedince (Pellegrino P. et al., 2014).

2.4. MENINGOKOKOVÉ MENINGITIDY

Původcem onemocnění je *Neisseria meningitidis*. Přibližně 90 - 95 % všech meningokokových onemocnění se manifestuje jako meningitida, sepse nebo kombinace obou forem onemocnění, méně častá je akutní meningokokémie, ostatní formy onemocnění jsou raritní (Křížová P. a Rožnovský L., 2011). Závažnost závisí zejména na klinické formě onemocnění, smrtnost meningokokové sepse dosahuje až 25 %. U smíšené formy, která je nejčastější, vyskytuje se až u poloviny pacientů, se smrtnost pohybuje kolem 5 %. Izolovaná meningitida má smrtnost kolem 2 % (Křížová P. a Rožnovský L., 2011). Každý rok je v ČR diagnostikováno kolem 100 invazivních onemocnění, v roce 2012 a 2013 bylo zjištěno celkem 64, resp. 59 invazivních meningokokových onemocnění, což představuje nemocnost 0,6/100 000 obyvatel, nejvyšší věková nemocnost je v nejmladších věkových skupinách ve věkové skupině dětí 0-11 měsíčních to je 11,9/100 000, v této věkové skupině lze pozorovat vzestupný trend nemocnosti. Ve věkové skupině 15 – 19letých se oproti třem předcházejícím rokům snížila nemocnost na polovinu na 1,1/100 000 obyvatel (Křížová P. et al., 2013; Křížová P. et al., 2014) *Neisseria meningitidis* séroskupiny B byla v roce 2012 i 2013 nejčastějším původcem invazivních onemocnění, způsobila 71,9 % a 71, 2 % všech

onemocnění, *N. meningitidis* séroskupiny C způsobila 12,5 % a 11,6 % onemocnění, séroskupina Y a séroskupiny W135 zůstávají vzácnými původci onemocnění (Křížová P. et al., 2014). Preventivním opatřením je vakcinace, v současnosti je možné vakcinací předcházet onemocnění způsobené séroskupinou A, C, Y, W135 a nově i séroskupinu B. Surveillance onemocnění, umožní rozhodnout, zda a pro koho je vakcinace vhodná, eventuálně i její začlenění výhledově do očkovacího kalendáře v ČR.

2.5. MENINGITIDY ZPŮSOBENÉ DALŠÍMI PATOGENY

2.5.1. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae způsobuje sepse a meningitidy novorozenců a kojenců nejčastěji do 3 měsíců věku. Výjimečně se uplatňuje původce onemocnění u dospělých imunosuprimovaných pacientů hlavně diabetiků, pacientů s renální insuficiencí, pacientů s porušenou mukokutánní bariérou (Edwards MS. a Baker CJ., 2005; Oyanguren B. et al., 2015). Preventivním opatřením je u novorozenců a malých dětí screeningové vyšetření gravidních v 35. – 37. týdnu těhotenství, které bylo v ČR schváleno v roce 2004, čímž došlo k poklesu incidence těchto závažných neuroinfekcí u novorozenců a kojenců. (Šimetka O. et al., 2010; Měchurová A. et al., 2004).

2.5.2. Viridující streptokokoky

Viridující streptokokoky například *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis* jsou běžnou součástí mikroflóry dutiny ústní. U pacientů s nedostatečnou hygienou dutiny ústní, kariesním chrupem, zákroky v dutině ústní, imunosupresí se mohou uplatnit i jako původci meningitidy. Častěji způsobují mozkové abscesy s nutností neurochirurgického ošetření (Deutschmann MW. et al., 2013; Fukushima K. et al., 2012). Výskyt je vzácný, pohybuje se kolem 5 – 9 % všech diagnostikovaných meningitid, ale průběh může být závažný (Fukushima K. et al., 2012).

2.5.3. Stafylokokové meningitidy

Meningitidy způsobené *Staphylococcus aureus* patří mezi závažné onemocnění. *Staphylococcus aureus* patří mezi 5 nejčastěji diagnostikovaných původců meningitid (Džupová O. et al., 2009; Pintado V. et al., 2002). Mortalita se pohybuje mezi 27 – 37 %. Stafylokokové meningitidy jsou jednak komunitní, poté až v 75 % lze nalézt zdroj infekce v jiných orgánech, nejčastěji je prokázána endokarditida, ale také často vznikají v souvislosti s nemocniční péčí, největší riziko představují neurochirurgické zákroky (Aguilar J. et al., 2010; Pintado V. et al., 2002). Nebezpečí představuje zvláště šíření rezistentních kmenů MRSA, která ve studiích z USA u původců meningitid dosahovala až 50 % USA (Aguilar J. et al., 2010). Koaguláza negativní stafylokoky se uplatňují jako původci meningitid u pacientů, kteří mají zavedenou drenáž likvorových cest.

2.5.4. Gramnegativní bakterie

Meningitidy způsobené gramnegativními bakteriemi *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* jsou v běžné populaci méně časté (Džupová O. et al., 2009). *Escherichia coli* je častým původcem zánětů mozkových blan u novorozenců a malých dětí (Basmaci R. et al., 2015). U dospělých se nejčastěji jedná o nosokomiální meningitidy, eventuálně onemocnění imunosuprimovaní pacienti. Zdroj infekce je poté nejčastěji v oblasti urogenitálního traktu nebo v oblasti gastrointestinálního traktu. Průběh onemocnění je většinou závažný, nebezpečí představují hlavně rezistentní kmeny na betalaktamové antibiotika.

2.5.5. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je vzácným původcem meningitid, ale vždy se jedná o velmi závažné onemocnění. Nejčastější klinickou formou je basilární meningitida a je spojena až s 50 % mortalitou (Philip N. et al., 2015). Onemocnění postihuje hlavně imunosuprimované pacienty, HIV pozitivní, ale byly popsány případy jednotlivých onemocnění u imunokompetentních jedinců v oblastech s nízkou prevalencí infekce (Hilal T. et al., 2014; Philip N. et al., 2015; Thwaites G. et al., 2009). Diagnostika je obtížná, kultivace je

zdlouhavá a většinou je delší prodleva mezi začátkem onemocnění a určení etiologie onemocnění. Přitom kauzální léčba je pro pacienta život zachraňující. PCR metody umožňují překlenutí této časové prodlevy k určení diagnózy. Očkování představuje prevenci hlavně závažných forem onemocnění.

3 ASEPTICKÉ NEUROINFEKCE

Aseptické neuroinfekce mají velký rozptyl klinických příznaků od nezávažných meningitid až po těžké encefalitidy s možným úmrtím nebo s neurologickými následky. Zánětlivé změny jsou často přítomny současně v mozkovém parenchymu, mozkomíšním moku, míšní tkáni a na úrovni periferních nervů. Rozsah postižení závisí spíše na individuálních faktorech než na původci onemocnění, proto jen na základě klinických příznaků je obtížné usuzovat na etiologii onemocnění (*Duniewicz M. et al., 1999*). Pro aseptické neuroinfekce je typickým likvorovým nálezem lymfocytární pleiocytóza, normální nebo mírně zvýšená bílkovina v likvoru s normální hladinou cukru a laktátu (*Beneš J. 2009; Duniewicz M. et al., 1999*).

3.1. ENTEROVIRY

Enteroviry patří mezi nejčastější virové původce aseptických neuroinfekcí zvláště v dětském věku. Do skupiny enterovirů patří viry Coxsackie, ECHO viry, polioviry a nezařazené enteroviry. Poliovirus je původcem závažných neuroinfekcí, ale současně představuje jediného původce z rodu enterovirů preventabilního vakcinací. I přes eradikaci polio v rozvinutých zemích, můžou některé enteroviry způsobit rozvoj chabých paréz, poté jsou označovány jako polio-like (*Špliňo M. a Chlábek R., 2015*), v současnosti je zvýšená pozornost věnována lidskému enteroviru D-68, který na podzim v roce 2014 způsobil v USA akutní parézy u 90 dětí a mladistvých, podobně závažný průběh byl zaznamenán i ve spojitosti s virem C-105 (*Špliňo M. a Chlábek R., 2015; CDS report. 2015*).

V ČR jsou enteroviry původci většinou klinicky nezávažných meningitid, meningoencefalitidy způsobují vzácněji. Možnost diagnostikovat enteroviry pomocí PCR všeobecně zvedlo objasněnost meningitid až na 70 % (*Franzen-Rohl E. et al., 2008*).

3.2. HERPETICKÉ VIRY

Je známo více než 8 lidských herpetických virů. Herpes simplex virus (HSV) 1 a 2 patří mezi geopolitní lidské viry. Infekci CNS způsobují vzácně, ale většinou se jedná o těžké encefalitidy, které mohou mít charakter až hemoragických nekrotizujících encefalitid. V zemích, kde nejsou rozšířené arbovirové infekce a borrelióza, patří herpetické viry mezi nejčastější původce encefalitid, způsobují až 19 – 42 % všech encefalitid (*Thompson C. et al., 2012*). V zemích s vysokým výskytem borreliózy tvoří pouze 1 % všech aseptických neuroinfekcí (*Tveitnes D. et al., 2012*). Studie se lišily definicí onemocnění, rozdíl byl v tom, jestli byly zahrnuty i meningitidy nebo jen encefalitidy. Ve všech uvedených studiích k diagnostice herpetických infekcí byla použita PCR metoda (*Thompson C. et al., 2012; Tveitnes D. et al., 2012; Davis LE., 2008*).

Rozvoj neuroinfekce během infekce virem varicella zoster (VZV) je způsobena jednak přímým působením viru, ale uplatňují se i imunologické mechanismy. Infekce je diagnostikovaná klinicky na základě typických kožních eflorescencí (*Thompson C. et al., 2012*). Na druhou stranu jsou popsány i nálezy VZV v likvoru bez výsevu exantému, detekce viru je možná potom molekulárně genetickými metodami (*Gilden D. et al., 2010*). Záněty v CNS jak v průběhu neštovic, tak při reaktivaci viru při pásovém oparu, jsou často závažné encefalitidy i s paretickými komplikacemi. V literatuře jsou popsána úmrtí v souvislosti s varicelou, například v souboru amerických autorů 3 děti s varicelovou encefalitidou zemřely (*Science M. et al., 2014*). V současnosti je navíc věnována zvýšená pozornost vaskulopatiím v centrálním nervovém systému. V souvislosti s infekcí virem varicella zoster byly na magnetické rezonanci pozorovány jak hemoragie, tak ischemie v CNS (*Chiang F. et al., 2014*). Vakcinace proti neštovicím a pásovému oparu, představuje prevenci závažných neurologických komplikací, hlavně postherpetických neuralgií.

CMV a Epstein Barrová virus (EBV) způsobují neuroinfekce u imunokompromitovaných pacientů (*Thompson C. et al., 2012; Davis LE., 2008*). Detekce viru v likvoru je prováděna pomocí PCR a pomocí real-time PCR je stanoveno množství viru v likvoru.

3.3. ARBOVIRY

Značný vliv na etiologii onemocnění mají geografické souvislosti, hlavně arbovirů, které jsou přenášeny různými členovci. Arbovirové infekce vykazují přírodní ohniskovost. V našich podmínkách je jednoznačně nejčastější klíšťová encefalitida, na jižní Moravě se vyskytuje např. virus Ťahyňa, na Slovensku virus Čalovo, v dalších zemích např. Japonská encefalitida B, východní koňská encefalitida, venezuelská koňská encefalitida, onemocnění způsobené virem Toscana. Navíc byl v roce 2012 zachycen na jižní Moravě komár *Aedes albopictus*, který může přenášet horečku dengue a chikungunya (*Kazdová K. a Hubálek Z., 2010; Šebesta O. et al. 2009*). Také bylo v ČR prokázáno autochtonní onemocnění Západonilskou horečkou (*Vlčková J. et al., 2015*).

V České republice je nejčastější arbovirózou infekce virem klíšťové meningoencefalitidy s incidencí 5-10/100000 obyvatel, letalita onemocnění se pohybuje v rozmezí 0,2-3,9 % (*Smišková D. et al., 2013*). K prevenci onemocnění je dostupná účinná vakcína od 70. let. Dle doporučení WHO je vakcinace vhodná pro všechny osoby žijící v endemické oblasti včetně dětí, pokud je incidence vyšší než 5/100 000 (*Who Publication 2011*).

Proočkovanost u nás kolísá kolem 20 %, na rozdíl od Rakouska, kde je naočkováno alespoň jednou dávkou až 86 % populace. V důsledku vakcinace bylo v Rakousku v roce 2010 zaznamenáno jen 58 případů onemocnění, jedná se o výrazný pokles z původních 700 případů ročně (*Amicizia D. et al., 2013; Zavadská D. et al., 2013*). Vzhledem k průběhu onemocnění, kdy rozvoj zánětu nervové soustavy nastupuje v druhé fázi onemocnění, s určitou časovou prodlevou po získání infekce, je již možné v diagnostice využít sérologické metody. Dostačující je stanovení specifických protilátek v séru (*Svobodová M. et al., 2010*).

3.4. PŘÍUŠNICE

Při příušnicích probíhá neuroinfekce většinou jako nezávažná meningitida, přesto se může výjimečně objevit také těžší encefalitida s postižením mozečku nebo postižení sluchu. Očkování proti příušnicím je v ČR součástí pravidelného očkovacího kalendáře u dětí. Výskyt epidemické parotitidy i u očkovaných souvisí s vyvanutím imunity a s cirkulací nového genotypu G viru příušnic v Evropě, který byl poprvé zaznamenán v ČR v roce 2006 (*Limberková R. a Lexová P., 2014*). Komplikace u očkovaných jsou však méně časté než u

neočkovaných jedinců (*Limberková R. a Lexová P., 2014; Yung CF. et al., 2011*). V Anglii v souboru pacientů s parotitidou v roce 2002 – 2006 se meningitida vyskytovala u 0,35 % pacientů s příušnicemi (*Yung CF. et al., 2011*).

3.5. CHŘIPKA

Neurologické komplikace se častěji rozvinou během chřipky A, u chřipky B jsou neurologické komplikace vzácnější a postihují většinou děti (*Newland G. et al., 2003; Morishima T. et al., 2002; Petroušová L. et al., 2013*). Chřipka patří mezi preventabilní onemocnění. Neurologické komplikace chřipky jsou sice relativně vzácné, ale často závažné, mohou vyústit v úmrtí nebo trvalé následky. Rozšíření vakcinace proti chřipce představuje i prevenci neurologických komplikací.

3.6. HEPATITIDA E

Hepatitida E (HEV) přichází v České republice do úvahy jednak jako importované onemocnění, jedná se o hepatitidu E genotypu 1 a 2 s dominujícím fekálně orálním přenosem infekce. V poslední době je zaznamenána vyšší incidence autochtonní hepatitidy E, genotypu 3, získané v tuzemsku (*Chalupa P. et al., 2014; Trmal J. et al., 2012*). Rezervoárem viru hepatitidy E genotypu 3 jsou zvířata nejčastěji prasata, virus byl nalezen i u daňků, jelenů, psů, bizonů, hlodavců i měkkýšů. Neurologické postižení patří mezi nejčastější extrahepatální manifestaci virové hepatitidy E, rozvine se u 2 – 5 % pacientů (*Kamar N. et al., 2011*). Klinický obraz zahrnuje aseptické meningitidy, encefalitidy s křečemi, polyradikuloneuritidy, syndrom Guillain – Barré, postižení periferních nervů, parézy hlavových nervů, transversální myelitidy, myopatie (*Kamar N. et al., 2011; Kamar N. et al., 2015*). Průkaz viru je možný kombinací sérologického vyšetření i přímého průkazu viru v séru, stolici nebo likvoru. Diagnostika má význam hlavně epidemiologický, z hlediska prevence význam spočívá hlavně v upozornění na vhodné stravovací návyky spojené s konzumací dostatečně tepelně upraveného masa.

3.7. LYMESKÁ BORRELIÓZA

Borrelia burgdorferi v endemických oblastech způsobuje až 2/3 aseptických meningitid (Tveitnes D. et al., 2012). Podle českého i evropského doporučení přímá diagnostika borrelií nepatří mezi standardní metody pro nízkou senzitivitu a specifitu, diagnostika neuroborreliózy spočívá v detekci specifických protilátek v likvoru (Dlouhý P. et al., 2011; Mygland A. et al., 2010).

4. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo prokázat význam molekulárně genetických metod v diagnostice neuroinfekcí, jejich porovnání s klasickými diagnostickými metodami. Současně bylo sledováno ovlivnění péče o pacienty, jejich léčby, úpravy terapie, deeskalace terapie, zkrácení hospitalizace. Zvýšení objasněnosti závažných neuroinfekcí vede k zlepšení surveillance onemocnění. Práce měla navíc prokázat důležitost preventivních opatření hlavně vakcinace v prevenci neuroinfekcí.

Hlavním cílem bylo zjistit:

- etiologii neuroinfekcí v 10letém období
- podíl jednotlivých původců neuroinfekcí v souboru
- stanovení závažnosti jednotlivých onemocnění
- stanovit počet onemocnění diagnostikovaných pouze PCR
- srovnání metod kultivačních a PCR
- srovnání metod sérologických a PCR
- stanovit význam preventivních opatření, význam vakcinace

5. MATERIÁL A METODY

Do souboru byli zařazeni pacienti s diagnózou akutní neuroinfekce, kteří byli hospitalizováni na Klinice infekčního lékařství Fakultní nemocnice Ostrava v desetiletém období 2004 až 2013, u nichž byla diagnóza potvrzena na základě klinického stavu a výsledkem likvorového vyšetření. Kritérium pro stanovení diagnózy byl počet elementů v likvoru převyšující 5 elementů/1 μ . Dle toho neuroinfekce byla prokázána u 1463 pacientů, z nichž 283 pacientů mělo purulentní meningitidu a 1180 pacientů s aseptickou meningitidou. V souboru jsou pacienti od 4 měsíců věku do 86 let.

Lumbální punkce byla prováděna buďto přímo na našem pracovišti nebo na spádovém oddělení a pacient byl přeložen k další léčbě již s výsledkem na Klinikou infekčního lékařství. Pokud byl klinický stav pacienta dobrý, lumbální punkce se neopakovala. Vyšetření likvoru bylo prováděno v biochemické laboratoři Fakultní nemocnice v Ostravě nebo ve spádové nemocnici. Pro názornost jsou normální hodnoty likvoru uvedeny v tabulce.

Tabulka 1: Fyziologické hodnoty likvoru

Parametr	Fyziologické rozpětí
Bílkovina (g/l)	0,2 – 0,4
Glukóza (mmol/l)	2,34 – 3,66
Chloridy (mmol/l)	120 - 130
Laktát (mmol/l)	1,2 – 2,1
Elementů (1 μ l)	do 5

5.1. PURULENTNÍ MENINGITIDY

Při podezření na purulentní meningitidu byl likvor vyšetřen mikroskopicky, latex aglutinací a kultivačně na Zdravotním ústavu Ostrava nebo ve spádových laboratořích. Latex aglutinace byla vyšetřována soupravami, které byly určeny pro průkaz bakteriálních antigenů v likvoru a umožňovaly prokázat následující původce: *Haemophilus influenzae* typ b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis* sérologických skupin A, C, Y, W135 a dále séroskupiny B, která má společný antigen s *Escherichia coli*. Mikroskopie a

kultivace byla prováděna standardními mikrobiologickými metodami v mikrobiologických laboratořích Zdravotního ústavu nebo ve spádových laboratořích. Kromě likvoru byla vyšetřena hemokultura, případně jiný biologický materiál (petechie, kloubní punktát, mozkový absces) z míst, kde bylo možné předpokládat výskyt patogena. Navíc mimo uvedených klasických mikrobiologických vyšetření bylo vyšetření rozšířeno o molekulárně genetické metody. PCR vyšetření bylo prováděno na Oddělení molekulární biologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. PCR diagnostika byla použita k rychlé detekci nejčastějších původců komunitních hnisavých meningitid od roku 2004. Pomocí PCR bylo možné stanovit *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (do roku 2011 jen sérotyp b, od roku 2011 i non b sérotypy), *Neisseria meningitidis* včetně sérotypizace a *Listeria monocytogenes*. V průběhu uplynulých 10 let byla metodika postupně aktualizována (Tabulka 2). V současné době laboratoř diagnostikuje bakteriální meningitidy metodou real-time PCR, která umožnila především zrychlení analýzy a zmenšila riziko kontaminace.

Tabulka 2: Přehled genů amplifikace

Patogen	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i> (typizace B, C)	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Období					
2004-2005	16S rRNA (1)	crgA, siaD (2)	16S rRNA (1)	16S rRNA (1)	-
2006-2009	porA (3)		ply (4)	bexA (5)	hlyA (6)
2009-2013				ompP (7)	

5.2. ASEPTICKÉ NEUROINFEKCE

U pacientů s aseptickou neuroinfekcí vyšetření zahrnovala sérologické vyšetření a detekce agens metodou PCR. Sérologická vyšetření byla prováděna na Zdravotním ústavu Ostrava nebo jsme část výsledku obdrželi ze spádových laboratoří. Vyšetřovány byly protilátky ze séra proti enterovirům, viru klíšťové encefalitidy, viru epidemické parotitidy, i bakterii *Mycoplasma pneumoniae*. Sérologická diagnostika enterovirů v séru byla provedena metodou ELISA (ELISA Enterovirus IgG, IgM, IgA, výrobce Virion/Serion), při diagnostice Coxsackie virů byl použit virus neutralizační test v mikromodifikaci s neutrálním barvením (home-made metoda - buněčná kultura CV-1 a virové kmeny Coxsackie B1-6, původ v SZÚ

Praha, NRL pro enteroviry). K diagnostice klíšťové encefalitidy v séru (případně v likvoru) byla použita metoda ELISA (Viditest anti-TBEV, Vidia) a mikromodifikace virus neutralizačního testu s neutrálním barvením (home-made metoda s použitím virového kmene Hypr a buněčné kultury PS). Vyšetření respiračních virů (viry chřipky, parainfluenzae, respiračního syncytiálního viru) probíhalo metodou ELISA a KFR, stejně tak i vyšetření viru epidemické parotitidy. Pro správnou diagnostiku lymeské borreliózy bylo použito všech dostupných metod vyšetření protilátek v likvoru a séru metodami ELISA (Borrelia recombinant, Test-Line) a Western blot (Anti-Borrelia Euroline WB, Euroimmun). Neuroborrelióza byla definována průkazem protilátek v likvoru nebo pozitivním výsledkem PCR metody v likvoru.

Molekulárně genetické metody byly využity k detekci enterovirů a herpetických virů, a to HSV 1 a 2, VZV, výjimečně virus EBV a CMV. V době chřipkové epidemie byl pomocí PCR vyšetřován virus chřipky ze stěru z nosohltanu a z likvoru. U jednoho pacienta byla PCR metoda použita k diagnostice virové hepatitidy E. Prováděna byla i PCR detekce *Borrelia burgdorferi* z likvoru.

V roce 2012 a 2013 bylo vyšetření likvoru rozšířeno díky grantové podpoře MZ ČR-RVO-FNOs/2013 o vyšetření elektronovým mikroskopem (EM) a byla prováděna kultivace viru. K vyšetření byl použit transmisní elektronový mikroskop JEM 1230. Vyšetření probíhalo na Zdravotním ústavu Ostrava, Oddělení virologie. Vzorky byly hodnoceny klasickou elektronovou mikroskopií s využitím techniky negativního barvení. Při diagnostice spirochét byly některé vzorky likvoru navíc hodnoceny i metodou imunoelektronové mikroskopie. Pro kultivaci viru byly použity buněčné linie CV-1 (opičí ledvinné buňky), PS (buňky prasečích ledvin) a LEP 19 (diploidní lidské embryonální plíce). Uvedená kombinace buněčných linií byla zvolena z důvodu zachytu co nejširšího spektra virů.

5.3. STATISTICKÉ METODY

V práci byly k porovnání použity běžné statistické hodnoty absolutní čísla, relativní čísla a mediány. Srovnávány byly jednotlivé metody vyšetření, počet pacientů, počet jednotlivých původců onemocnění, doba hospitalizace ve dnech, věk pacientů, počet pacientů s rozvojem komplikací i úmrtím, absolutní hodnoty C reaktivního proteinu (CRP) a počet elementů v likvoru. Pro analýzu rozptylu hodnot byly použity neparametrické testy, výpočty byly prováděny v programu Statistika.

6. VÝSLEDKY

6.1. PURULENTNÍ MENINGITIDY

V období od roku 2004 – 2013 bylo na Klinice infekčního lékařství hospitalizováno celkem 283 pacientů s purulentní meningitidou. Medián věku v celém souboru byl 48 let (4 měsíce-86 let), 50 pacientů (18 %) zemřelo. Původce se podařilo určit celkem u 202 pacientů (71 %). Lumbální punkce a odběr mozkomíšního moku na vyšetření byl proveden u všech 283 pacientů, likvor byl vždy vyšetřen mikroskopicky a kultivačně. Pomocí kultivace likvoru se podařilo určit etiologii onemocnění u 134 pacientů (47 %). Molekulárně genetické metody pro detekci nejčastějších původců purulentní meningitidy: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Listeria monocytogenes* v likvoru byly použity u 186 pacientů (65 %), u 97 pacientů (52 %) byl pozitivní výsledek (Tabulka 3).

V běžné praxi během posledních 10 let se PCR diagnostika dostala do rutinního používání (Graf 1). Porovnáme-li počet vyšetření v úvodu studie, je zřejmé, že došlo k zvýšení počtu vyšetřených vzorků a v současnosti má téměř každý pacient s purulentní meningitidou likvor vyšetřen i molekulárně genetickými metodami.

Hemokultura byla vyšetřena u 195 pacientů, s pozitivním nálezem u 38 pacientů (19 %), izolovaný průkaz z hemokultury byl u 9 pacientů (4 %). U 1 pacienta byl pozitivní nález pouze při vyšetření kloubního punktátu, při negativním vyšetření likvoru i hemokultury. U pacientů s meningokokovým onemocněním byly k vyšetření odeslány i stěry z kožní sufuze a 3 pacienti měli meningokoka prokázaného pouze z kožních sufuzí. V případě mozkového abscesu a meningitidy se u 3 pacientů podařilo určit agens pouze kultivačním vyšetřením materiálu z mozkového abscesu.

Pro průkaz původce onemocnění byl likvor nejdůležitějším biologickým materiálem, z 202 určených patogenů bylo 186 (92 %) prokázáno v likvoru (Tabulka 3).

Kombinací všech vyšetřovacích metod a všech dostupných biologických materiálů se postupně během 10 let podařilo zvyšovat objasňenost purulentních meningitid až na více než 80 %, z původních 55 % objasněných meningitid (Graf 1).

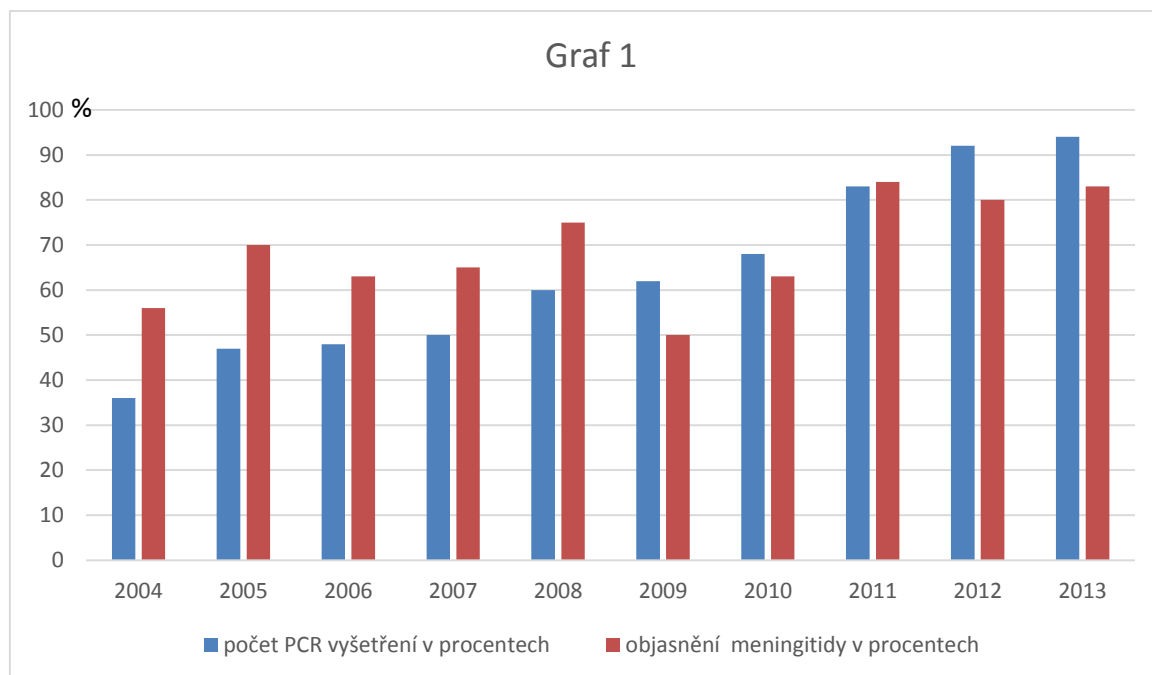
Původcem purulentních meningitid byla poměrně široká škála mikrobu. Jednotliví původci se lišili se počtem způsobených onemocnění, převažovali klasičtí původci meningitid, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* (Tabulka 5). K detekci uvedených původců sloužila právě metoda PCR, kterou jsme používali v našem souboru pacientů. Takto nastavenou PCR by byl teoreticky možný záchyt až 73 % onemocnění (Graf 2).

Vzhledem k variabilitě původců 24 % patogenů by PCR diagnostikou zachytit nešlo, proto jsme v praxi používali vždy několik metod současně.

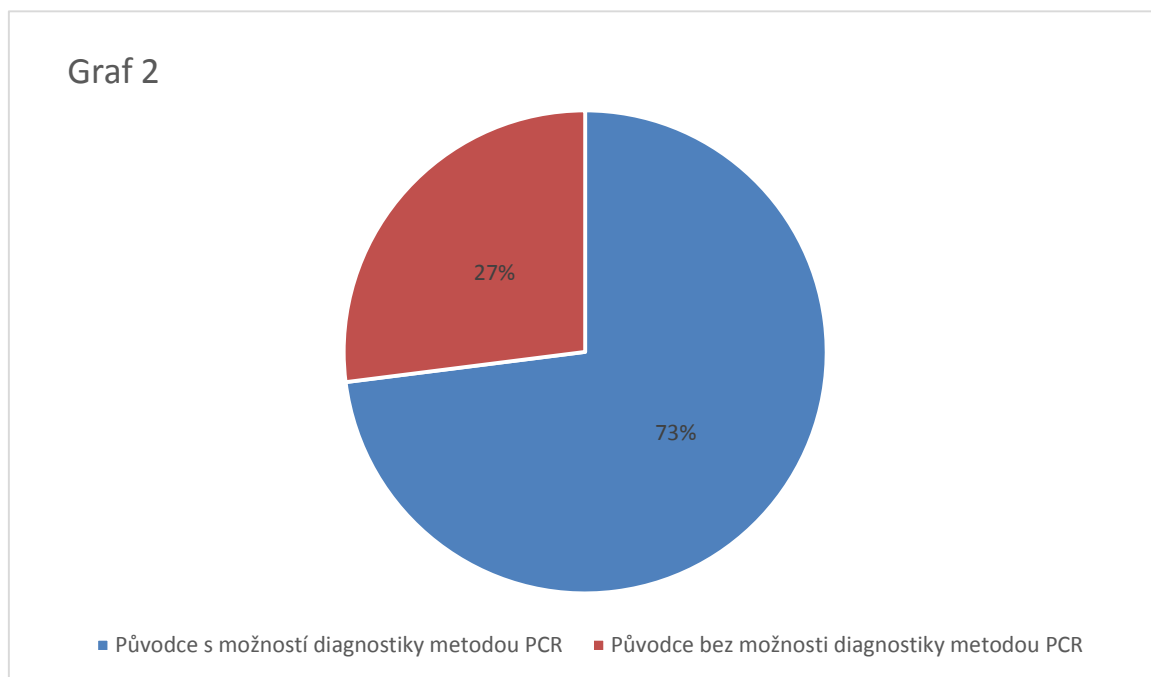
Tabulka 3: Vyšetření likvoru u 283 pacientů

Metoda průkazu etiologie	Celkem vyšetření	Pozitivní nález
Kultivace likvoru	283	134 (47 %)
PCR diagnostika	186	97 (52 %)

Graf 1: Využití metody PCR v letech 2004 – 2013 u 283 pacientů a porovnání s objasněním etiologie



Graf 2: Zastoupení původců s ohledem na současné možnosti diagnostiky metodou PCR



Tabulka 4: Biologický materiál s pozitivním nálezem původce

Materiál	Celkem vyšetření	Pozitivní nález
Likvor	283	186
Hemokultivace	195	38
Kožní sufuze	4	3
Kloubní punktát	1	1
Mozkový absces	9	3

Tabulka 5: Původci purulentních meningitid u 202 pacientů

Původce	Počet onemocnění
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	70
<i>Neisseria meningitidis</i>	51
<i>Haemophilus influenzae</i>	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	15
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6
<i>Streptococcus vestibularis</i>	2
<i>Streptococcus beta hemolyticus skup.G – blíže neurčen</i>	1
<i>Streptococcus epidermidis</i>	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2
<i>Streptococcus anginosus</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i>	2
<i>Streptococcus viridans</i>	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Staphylococcus.warneri</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3
<i>Actinomyces sp.</i>	1
<i>Bacteroides sp.</i>	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
Celkem	202

6.1.1. Pneumokokové meningitidy

Z celkového souboru 283 pacientů byl pneumokok diagnostikován u 70 pacientů (25 %), z toho 8 dětí do 19 let. Medián věku pacientů s pneumokokovou meningitidou byl 59 let (9 měsíců – 83 let). V souboru mírně převažovaly ženy (37 pacientů). Již vstupní likvorový nález svědčil o purulentní meningitidě, medián počtu elementů byl 1700/1 μ l, s minimálním nálezem 15/1 μ l. První vyšetření CRP svědčilo o bakteriální infekci, medián hodnoty dosahoval 200 mg/l (30 – 470). Medián hospitalizace byl 18 dnů (1 – 65). V souboru uvedených pacientů 18 zemřelo (26 %), u 8 pacientů (11 %) se rozvinula porucha sluchu, u dalších 10 pacientů (14 %) bylo nutné operační řešení.

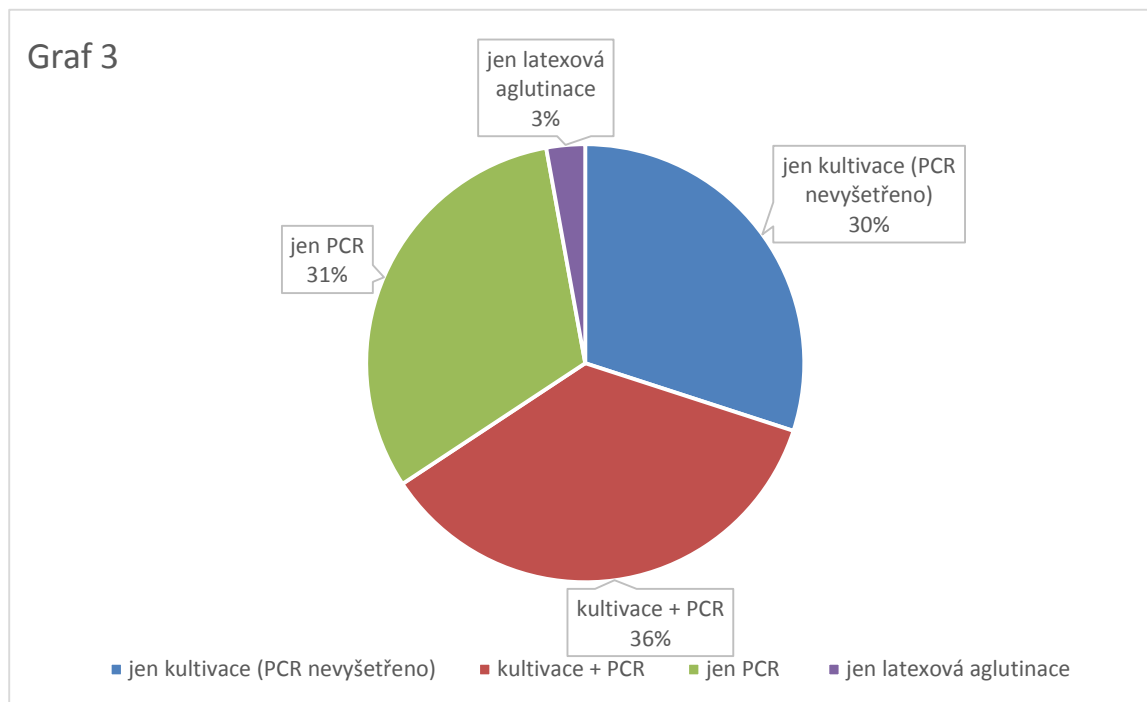
Původce *Streptococcus pneumoniae* byl stanoven z likvoru, hemokultury a pouze u jednoho pacienta z kloubního punktátu při rozvinuté sekundární artritidě. Je možné, že použití metody PCR by prokázalo patogena i v likvoru, ale likvor byl vyšetřen pouze kultivačně. Hemokultura byla vyšetřena u 63 pacientů, s pozitivním nálezem pouze u 7 pacientů. Nikdy nebyl pneumokok izolovaně prokázán pouze v hemokultuře.

Tabulka 6: Výsledky vyšetření u 70 pacientů s prokázanou pneumokokovou meningitidou

Vyšetření	Celkem	Pozitivní
Hemokultura	63 (90 %)	7 (10 %)
Likvor kultivace	70 (100 %)	46 (65 %)
Likvor PCR	47 (67 %)	47 (67 %)
Kloubní punktát kultivace	1	0
Kloubní punktát PCR	1	1

Nejpřínosnější v diagnostice pneumokokové meningitidy byla metoda PCR, která ze 47 vyšetření byla pozitivní u všech pacientů. Latexovou aglutinací v likvoru bylo onemocnění prokázáno u 2 pacientů, kteří měli kultivační vyšetření negativní, PCR vyšetření provedeno nebylo. Izolovaný průkaz kultivací likvoru byl u 21 pacientů (30 %), u těchto pacientů nebyl likvor metodou PCR vyšetřen. Současná pozitivita obou vyšetření jak kultivace, tak PCR metody byla u 25 pacientů (36 %). U 22 pacientů (31 %) byla metoda PCR jedinou pozitivní metodou, kterou bylo onemocnění prokázáno (Graf 3).

Graf 3: Podíl jednotlivých metod v diagnostice 70 pacientů s pneumokokovou meningitidou – vyšetření likvoru



Určení sérotypů provádí Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy Státního zdravotního ústavu v Praze od roku 2007. V období od roku 2007 do roku 2012 bylo možné stanovit sérotyp pouze z kmenů, které byly získány kultivací, od roku 2013 se stanovují sérotypy i u pneumokoků stanovených metodou PCR. V našem souboru se podařilo učít sérotypy u 28 pacientů, většinou z kmenů, které byly získány kultivací, pouze u 2 pacientů v roce 2013 byl sérotyp určen ze záchytu PCR metodou. Potenciálně preventabilních sérotypů bylo až 79 %.

Z uvedených pacientů byla očkovaná pouze jedna pacientka po transplantaci jater polysacharidovou 23valentní vakcínou a 1,5 roku po očkování došlo k rozvoji meningitidy způsobené sérotypem 19A. První kojeneček v našem souboru onemocněl v 2007, kdy ještě nebyla dostupná pravidelná vakcinace. U dítěte se rozvinula po onemocnění porucha sluchu a psychomotorická retardace. Druhý kojeneček onemocněl v roce 2013 a nebyl očkován z důvodu odmítnutí vakcinace matkou, dítě v důsledku onemocnění ohluchlo na obě uši.

6.1.2. Meningokokové meningitidy

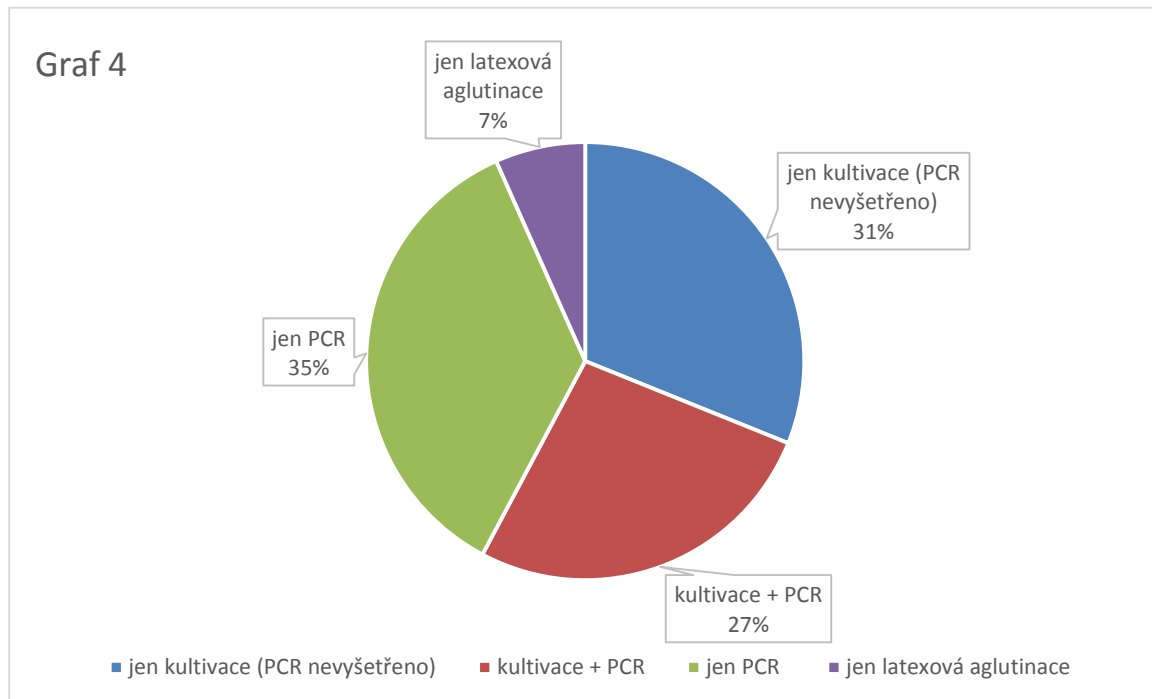
Z celkového souboru 283 pacientů byla *Neisseria meningitidis* diagnostikována u 51 pacienta (18 %). Medián věku byl 16 let (6 měsíců - 75 let), v souboru mírně převažovali muži (27 pacientů). Již vstupní likvorový nález svědčil o purulentní meningitidě, medián počtu elementů v likvoru byl 1500/1 μ l, s minimálním nálezem 3/1 μ l elementů. První vyšetření CRP většinou svědčilo o bakteriální infekci, medián hodnoty byl 168 mg/l (36 – 475). Medián hospitalizace byl 14 dnů (2 – 45). V souboru uvedených pacientů 1 pacient zemřel, u 3 pacientů (6 %) se rozvinula porucha sluchu, 1 pacient vyžadoval dlouhodobější ošetřování kožních defektů.

Tabulka 7: Výsledky vyšetření u 51 pacientů s prokázanou meningokokovou meningitidou

Vyšetření	Celkem	Pozitivní
Hemokultura	46 (90 %)	12 (24 %)
Likvor kultivačně	51 (100 %)	26 (51 %)
Likvor PCR	37 (73 %)	35 (68 %)
Kožní sufuze kultivace	1	0
Kožní sufuze PCR	4 (8 %)	3 (0,5 %)

Diagnostika *Neisseria meningitidis* byla prováděna z likvoru, hemokultury a v případě 4 pacientů z kožních sufuzí, které se rozvinuly v rámci meningokokové sepse (Tabulka 7). Hemokultura byla vyšetřena u 46 pacientů, s pozitivním nálezem u 12 pacientů. U 3 pacientů se jednalo o izolovaný průkaz z hemokultury, z toho u 2 pacientů byl likvor vyšetřen kultivačně i metodou PCR, u třetího pacienta byl likvor vyšetřen pouze kultivačně. Nejprůkaznější v diagnostice meningokokové meningitidy byla metoda PCR, která z 37 vyšetření byla pozitivní u pacientů 35 pacientů, nebyl zaznamenán falešně negativní výsledek, protože 2 pacienti měli onemocnění prokázáno pouze z hemokultury. Důležité je, že u 20 pacientů byla metoda PCR jedinou pozitivní metodou, kterou bylo onemocnění prokázáno, z toho u 17 pacientů z likvoru a 3 pacienti měli pozitivní nález z kožních sufuzí (Graf 4).

Graf 4: Podíl jednotlivých metod v diagnostice u 45 pacientů s meningokokovou meningitidou – vyšetření likvoru.



Pokud je prokázána *Neisseria meningitidis* v biologickém materiálu je důležité stanovit i séroskupinu meningokokoka. V našem souboru pacientů byla séroskupina stanovována v případě kultivačního záchytu meningokokoka i v případě průkazu metodou PCR. Metodou PCR bylo možno rozlišit pouze séroskupinu B a C. V souboru pacientů převažovala séroskupina B, celkem 35 pacientů (67 %), séroskupina C byla diagnostikována u 8 pacientů (16 %), séroskupina Y byla prokázána u 1 pacienta, séroskupina obsahující komplex antigenů YW 135 u 2 pacientů (1x kultivační průkaz, 1x pouze latex aglutinací). U 5 pacientů (14 %) se nepodařilo séroskupinu určit, z toho 3 pacienti měli diagnostiku pouze pomocí PCR, 1 pacient měl pozitivní záchyt i kultivační metodou z likvoru a 1 pacient měl meningokokoka prokázaného v hemokultuře. Pokud byl meningokok prokázán současně kultivačně i metodou PCR, vždy byl ve shodě průkaz séroskupiny.

Žádný z našich pacientů nebyl očkován.

Tabulka 8: Séroskupina *Neisseria meningitidis* u 51 pacientů

Séroskupina <i>Neisseria meningitidis</i>	Počet pacientů
Séroskupina B	35 (67 %)
Séroskupina C	8 (16 %)
Séroskupina Y	1 (2 %)
Komplex antigenů YW 135	2 (4 %)
Neurčeno	5 (10 %)

6.1.3. Hemofilové meningitidy

Z celkového souboru 283 pacientů byl *Haemophilus influenzae* diagnostikován u 12 pacientů (4 %). Medián věku pacientů s hemofilovou meningitidou byl 42 let (4 měsíce - 83 let), v souboru převažovali muži (8 pacientů). Již vstupní likvorový nález svědčil o purulentní meningitidě, medián počtu elementů byl 1600/1 μ l, s minimálním nálezem 330/1 μ l elementů. První vyšetření CRP většinou svědčilo o bakteriální infekci, medián hodnoty byl 145 mg/l (82 -267). Medián doby hospitalizace byl 21 dnů (6 – 45). V souboru uvedených pacientů 2 pacienti zemřeli, u 2 pacientů byla nutná neurochirurgická operace, u 1 pacienta (8leté dítě) se rozvinula po onemocnění epilepsie a mentální retardace.

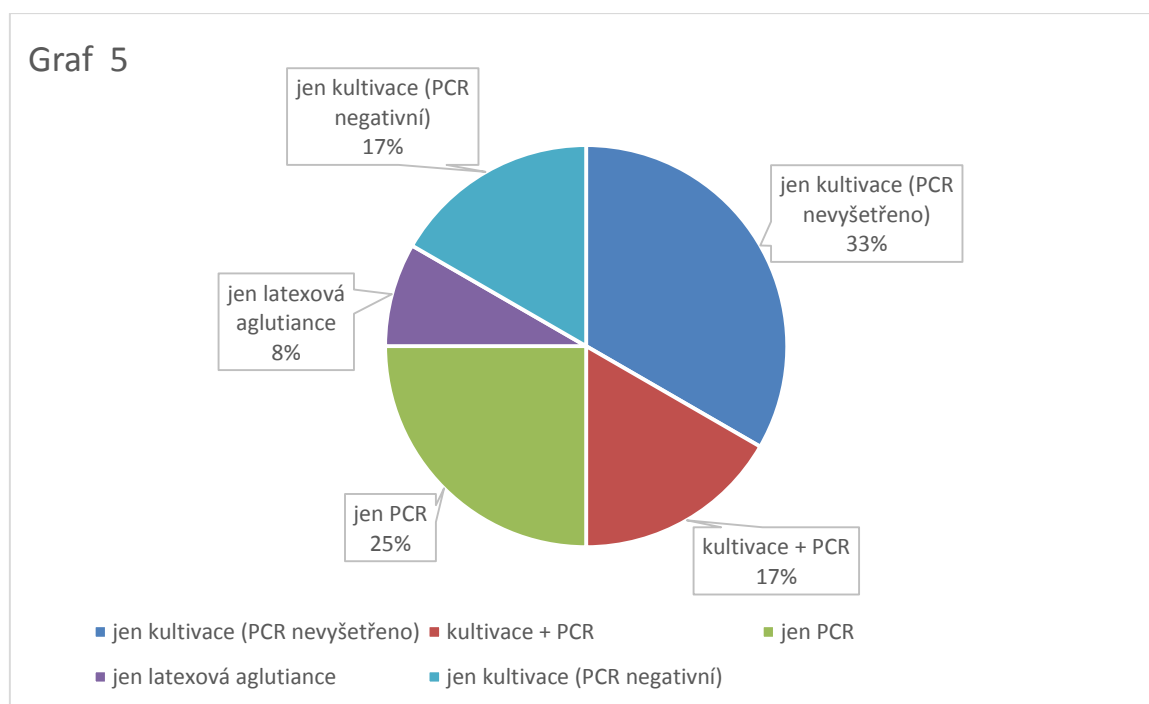
Tabulka 9: Výsledky vyšetření u 12 pacientů s hemofilovou meningitidou

Vyšetření	Celkem	Pozitivní
Hemokultura	5 (42 %)	0
Likvor kultivačně	12 (100 %)	8 (67 %)
Likvor PCR	7 (58 %)	5 (42 %)

Diagnostika *Haemophilus influenzae* byla prováděna z likvoru a hemokultury (Tabulka 9). Metodou PCR byl likvor vyšetřen u 7 pacientů s pozitivním nálezem u 5 (71 %). U 2 pacientů, kteří měli negativní PCR vyšetření a pozitivní kultivační vyšetření, byl prokázán *Haemophilus influenzae* non b. U třetího pacienta, u kterého byl také prokázán non b sérotyp, byla PCR metoda schopna detekovat jen obecný bakteriální genom, ale v případě předchozích 2 pacientů byl i obecný bakteriální genom negativní. PCR diagnostika byla schopna v té době detekovat pouze sérotypy b, a až po zkušenosti s non b sérotypy byla v roce 2010 rozšířena o

diagnostiku non b sérotypů. U 3 pacientů byla metoda PCR jedinou pozitivní metodou. Současná pozitivita PCR a kultivace byla u 2 pacientů, izolovaně pozitivní kultivační vyšetření bylo u 6 pacientů, z toho 2 měli negativní PCR vyšetření, jednalo se o již zmíněné non b sérotypy. Izolovaně latexovou aglutinací z likvoru bylo onemocnění prokázáno u 1 pacienta, uvedený pacient měl likvor vyšetřen pouze kultivací, PCR vyšetření provedeno nebylo (Graf 5).

Graf 5: Podíl jednotlivých metod v diagnostice hemofilových meningitid u 12 pacientů.



V případě pozitivního kultivačního nálezu byl dále sérotyp dourčen v Národní referenční laboratoři pro hemofilové nákazy SZU Praha (Tabulka 10). Pouze jedno dítě ve věku 11 měsíců bylo řádně očkováno, přesto prodělalo hemofilovou meningitidu sérotypem *Haemophilus influenzae* b, byl dourčen i biotyp 1.

Tabulka 10: Sérotypy *Haemophilus influenzae* u 12 pacientů

Sérotyp <i>Haemophilus influenzae</i>	Počet pacientů
Sérotyp b	7
Sérotyp f	2
Sérotyp neurčen	3

6.1.4. Listeriové meningitidy

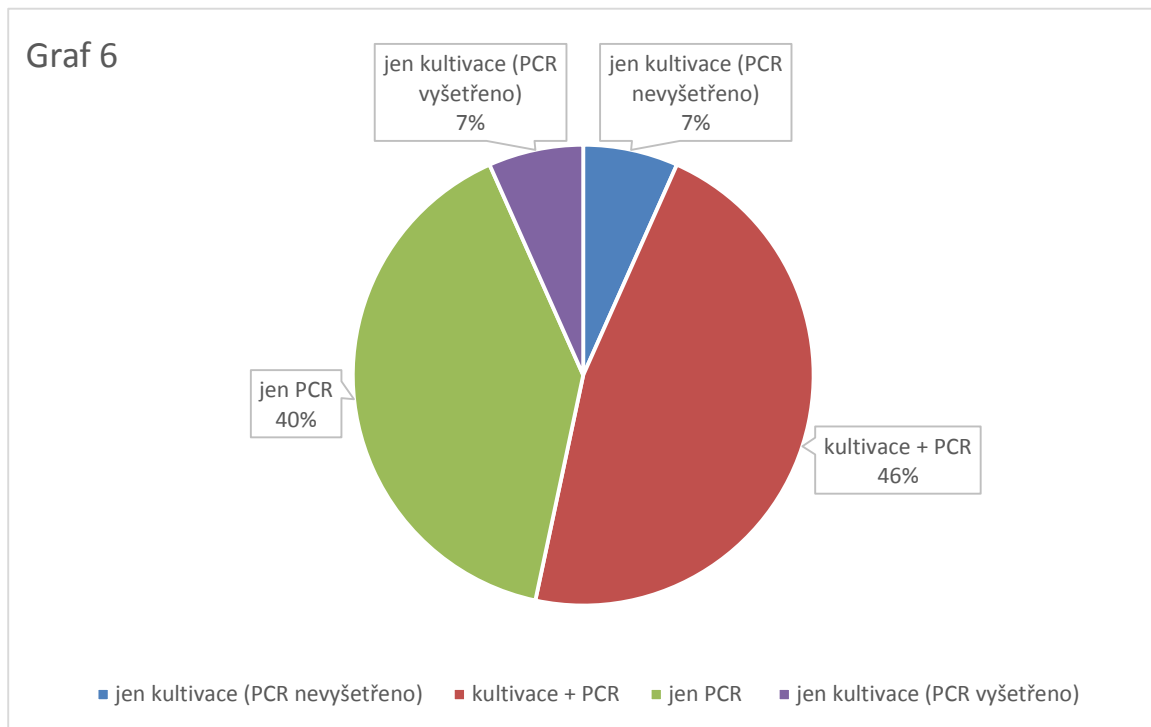
Z celkového souboru 283 pacientů byla *Listeria monocytogenes* diagnostikována u 15 pacientů (5 %). Medián věku pacientů s listeriovou meningitidou byl 60 let (6 – 82), v souboru převažovali muži (8 pacientů). Medián počtu elementů v likvoru byl 300/1 μ l, s minimálním nálezem 80/1 μ l elementů. První vyšetření CRP většinou svědčilo o bakteriální infekci, medián hodnoty dosahoval 132 mg/l (4 – 401). Medián doby hospitalizace byl 14 dnů (1 – 60). V souboru uvedených pacientů 8 pacientů zemřelo. Závažná imunoprese byla zjevná u 6 pacientů, z toho se jednalo o 4 pacienty s onkologickou léčbou, 1 pacient měl biologickou léčbu proktokolitidy a 1 pacient byl cirhotik. U pacienta s proktokolitidou byl navíc v likvoru metodou PCR prokázán virus CMV a pacient byl léčen i antivirotiky

Tabulka 11: Vyšetření u 15 pacientů s listeriovou meningitidou

Vyšetření	Celkem	Pozitivní
Hemokultura	12 (80 %)	3 (20 %)
Likvor kultivačně	15 (100 %)	9 (60 %)
Likvor PCR	14 (93 %)	13 (87 %)

Diagnostika *Listeria monocytogenes* byla prováděna z likvoru a hemokultury (Tabulka 11). Metodou PCR byl likvor vyšetřen u 14 pacientů s pozitivním nálezem u 13 pacientů, z toho u 6 pacientů (40 %) se jednalo o jediný pozitivní výsledek. U jednoho pacienta PCR metoda listeriózu neprokázala, ale byla pozitivní kultivace. Současná pozitivita PCR a kultivace byla u 7 pacientů (47 %), izolovaně pozitivní kultivační vyšetření bylo u 1 pacienta, PCR vyšetření u uvedeného pacienta provedeno nebylo (Graf 6).

Graf 6: Podíl jednotlivých metod v diagnostice listeriových meningitid u 15 pacientů



Listerióza není onemocnění, kterému lze předcházet očkováním, ale včasná diagnostika má vliv hlavně na úpravu cílené antimikrobiální terapie, která je zásadní pro vývoj onemocnění a následků po onemocnění.

6.1.5. Porovnání přínosu PCR a kultivace v diagnostice purulentních meningitid

Tabulka 12: Klinické srovnání meningitid s možností diagnostiky PCR a všech meningitid

Původce	Počet pacientů	Věk (roky) medián	Hospitalizace (dny) medián	Komplikace (počet pacientů)	Úmrtí (počet pacientů)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	70	59	18	18 (26 %)	18 (26 %)
<i>Neisseria meningitidis</i>	51	16	14	4 (8 %)	1 (2 %)
<i>Haemophilus influenzae</i>	12	42	21	3 (25 %)	2 (17 %)
<i>Listeria monocytogenes</i>	15	60	14	-	8 (53 %)
Ostatní bakterie ⁽¹⁾	54	58	15	8 (15 %)	12 (22 %)
Neurčený původce	81	37	14	10 (12 %)	13 (16 %)
Všechny meningitidy	283	42 p< 0,0001	15 p<0,0001	43 (15 %)	54 (19 %)

⁽¹⁾ *Streptococcus agalactiae*, beta hemolytické streptokokoky, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus.warneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecium*, *Cryptococcus neoformans*, *Actinomyces* sp., *Bacteroides* sp., *Mycobacterium tuberculosis*

Z tabulky 12 vyplývá závažnost purulentních meningitid, u 15 % pacientů se rozvinuly komplikace, 19 % pacientů zemřelo. Nejvyšší letalita byla ve skupině pacientů s pneumokokovou meningitidou. Rozdíl v době hospitalizace mezi skupinami pacientů je

signifikantně významný, signifikantně se mezi sebou liší hlavně doba hospitalizace pacientů s pneumokokovou a meningokokovou meningitidou ($p=0,01053$), pacienti s pneumokokovou a neobjasněnou meningitidou ($p=0,000015$). Také rozdíly ve věkové distribuci onemocnění jsou signifikantně významné, největší rozdíl jsou mezi meningokokovým v porovnání s ostatními: pneumokoky ($p=0,0001$), listeriózou ($p=0,001$), ostatními agens ($p=0,0001$) i neurčenou etiologií ($p=0,00008$).

Významné je, že ze všech diagnostikovaných agens tvoří 133 pacientů (47 %) s teoreticky preventabilním onemocněním.

U 51 pacientů (18%) byly molekulárně genetické metody jediným pozitivním vyšetřením. Izolovaný průkaz molekulárně genetickými metodami dosahoval u každého původce téměř 30 % navíc diagnostikovaných meningitid. V případě listeriových meningitid PCR metody navíc objasnily původce až u 40 % pacientů (Tabulka 13).

Tabulka 13: Porovnání přínosu kultivace a PCR diagnostiky u jednotlivých původců

Původce	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Metody				
Kultivace negativní, PCR pozitivní	31 %	36 %	25 %	40 %
Kultivace pozitivní, PCR pozitivní	36 %	27 %	17 %	46 %
Kultivace pozitivní, PCR negativní	-	-	17 % ⁽¹⁾	7 %
Kultivace pozitivní, PCR neprovedeno	30 %	30 %	33 %	7 %

⁽¹⁾ Non b sérotypy

6.2. ASEPTICKÉ NEUROINFEKCE

V 10letém období bylo hospitalizováno celkem 1180 pacientů s aseptickou neuroinfekcí, medián věku v celém souboru byl 31 let (4 měsíce – n 83 let), 5 pacientů v celém souboru zemřelo. Lumbální punkce byla provedena u všech pacientů. Etiologii se podařilo objasnit u 705 pacientů (60 %). V diagnostice byly kombinované jak metody přímé PCR, elektronová mikroskopie (EM) a kultivace viru, tak metody nepřímé detekující tvorbu specifických protilátek. Etiologie onemocnění u všech pacientů je uvedena v tabulce 16. U 30 pacientů se kombinací několika vyšetřovacích metod navzájem podařilo zjistit více potenciálních původců onemocnění. Využití přímých metod v diagnostice je uvedeno v tabulce 15. EM a kultivace viru byla prováděna poslední 2 roky studie v rámci grantové studie. Objasněnost aseptických neuroinfekcí v průběhu 10 let stoupla z původních 40 % na více jak 80 % (Graf 7).

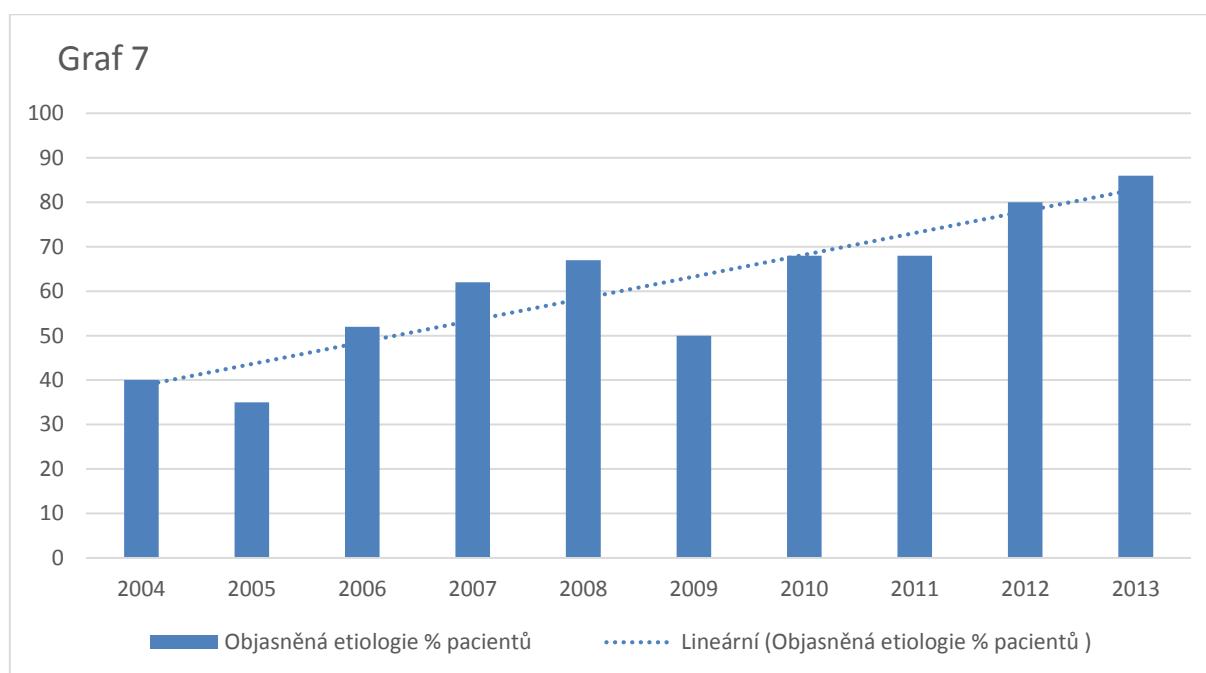
Tabulka 14: Původci aseptických neuroinfekcí u 705 pacientů 735 původců

Původce	Počet	Původce	Počet
Klíšťová encefalitida	186 (16 %)	Chřipka	3
<i>Borrelia burgdorferi</i>	307 (26 %)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2
Enteroviry	122 (10 %)	Epidem. parotitida	14 (1 %)
VZV	54 (5 %)	RSV	1
HSV 1,2	23 (2 %)	Toxoplasma gondi	1
CMV	2	HEV	1
EBV	2	Virus neurčen	17 (1 %)

Tabulka 15: Vyšetření u 1180 pacientů – přímé metody

Metoda	Počet vyšetření	Počet pozitivních nálezů
PCR enteroviry	368	104 (28 %)
PCR herpetické viry	367	34 (9 %)
PCR chřipka	12	2 (17 %)
PCR VHE	1	1
PCR epidemická parotitida	1	1
PCR <i>Borrelia burgdorferi</i>	100	2 (2 %)
Elektronová mikroskopie	78	65 (83 %)
Kultivace viru	38	16 (42 %)

Graf 7: Určená etiologie aseptických neuroinfekcí v procentech letech 2004 – 2013 u 1180 pacientů



6.2.1. Enteroviry

Enterovirová meningitida byla prokázána u 122 pacientů, medián věku byl 15 let (3 – 46). Medián hodnoty CRP byl 5mg/l, ale maximální hodnota dosahovala až 121 mg/l, likvorový nález odpovídal aseptické meningitidě, medián počtu elementů v likvoru byl 140 elementů/1 μ l (7 – 900). Medián hospitalizace byl 8 dnů (6 – 20). U většiny pacientů onemocnění probíhalo pod klinickým obrazem meningitidy, pouze 4 pacienti měli klinický obraz encefalitidy s kvalitativní poruchou vědomí, z toho se jednalo o jednoho pacienta s onemocněním Ruka-noha-ústa. U jednoho pacienta byla přítomna přechodně dysartrie a u jednoho pacienta enteroviry způsobili těžkou periferní lézi lícního nervu. Jiné parietické onemocnění zaznamenáno nebylo. Léčba antibiotiky nebo antivirotiky byla zahájena u 40 pacientů, u 20 pacientů byla ukončena do 2 dnů po zjištění etiologie, u 13 pacientů byla léčba ponechána do 14 dnů pro současný nález spirochet v EM a 7 pacientů bylo léčeno 10 dnů, diagnóza u těchto 7 pacientů byla stanovena s odstupem času sérologicky.

Diagnostika enterovirů pomocí metody PCR začala rutinně v roce 2006, z celkového počtu 1180 pacientů s aseptickou meningitidou mělo likvor vyšetřeno PCR na průkaz RNA enterovirů 368 pacientů (31 %). Pozitivní výsledek byl u 104 pacientů, což je 9 % ze všech pacientů s aseptickou meningitidou, ale 28 % ze všech pacientů, kteří měli likvor metodou PCR vyšetřen. U jednoho pacienta byl enterovirus detekován pouze ve stěru z puchýřku při exantémovém onemocnění Ruka – noha – ústa, z likvoru bylo vyšetření negativní. U uvedených 104 pacientů nebyla vyšetření prováděno duplicitně, takže sérologické vyšetření párových sér nebylo dále prováděno. Sérologicky byla při negativním PCR vyšetření prokázána infekce virem Coxsackie B4 u 4 pacientů, v 2. odběru krve s časovým odstupem 10 – 14 dnů od začátku infekce.

U 14 pacientů hospitalizovaných v letech 2005 a 2006, kdy se ještě metoda PCR nepoužívala, bylo onemocnění potvrzeno pouze sérologicky ze dvou vzorků krve.

Díky grantu byl v letech 2012 a 2013 byl navíc likvor u 30 pacientů vyšetřen i elektronovým mikroskopem a byla provedena virologická kultivace. Enteroviry se podařilo EM zachytit u 16 pacientů, z toho u 3 izolovaně a 13 pacientů mělo v EM i pozitivní nález spirochet. Kultivace viru byla úspěšná u stejných 16 pacientů z 30 provedených vyšetření. Uvedení pacienti měli vždy pozitivní i PCR vyšetření likvoru k průkazu enterovirů. V případě enterovirů se tedy kultivace viru a EM nestala přínosným vyšetřením.

6.2.2. Herpetické infekce

6.2.2.1. *Herpes simplex 1 a Herpes simplex 2*

Vyšetření PCR na průkaz DNA HSV 1 a 2 bylo zahájeno již v roce 2004. Jedná se o nejdéle používanou metodu. Celkem bylo provedeno u 315 pacientů (27 %). Pozitivní nález byl u 23 pacientů, což jsou jen 2 % všech pacientů a 7 % ze všech vyšetřených pacientů. Převažovala infekce virem HSV 1 u 18 pacientů, u 5 pacientů se jednalo o HSV 2 infekci. Medián věku byl 36 let (4 měsíce - 75 let). Medián počtu elementů v likvoru byl 150 elementů/ 1 μ l (15 – 500). CRP bylo u všech pacientů nízké, maximální hodnota dosahoval pouze 25mg/l. Medián hospitalizace byl 15 dnů (14 – 120). U 5 pacientů byly přítomny závažné komorbidity (onemocnění srdce, diabetes mellitus, alkoholismu a hematologické onemocnění). Pouze u 4 měsíčního chlapce se jednalo o primoinfekci.

Průběh onemocnění byl závažný, 7 pacientů mělo klinický obraz encefalitidy, z toho 4 pacienti měli prokázány na magnetické rezonanci změny v oblasti temporálních laloků, 1 pacientka ve věku 75 let zemřela. U 4 měsíčního dítěte s primoinfekcí onemocnění vedlo k psychomotorické retardaci. Závažný průběh byl spojen vždy s infekcí virem HSV 1 (Tabulka 16). U dvou pacientů byla infekce virem HSV (HSV1 i HSV 2) prokázána současně s pozitivními protilátkami, které odpovídaly neuroborrelióze. Klinický obraz odpovídal u obou pacientů meningitidě. Pouze u jednoho pacienta byla DNA viru HSV 1 prokázána až z 2. lumbální punkce s časovým odstupem týdne po 1. lumbální punkci, jednalo se o hematologického pacienta s transplantací kostní dřeně. Všichni pacienti byli léčeni aciklovirem, v případě lehkého průběhu 14 dnů, v případě encefalitid délka léčby byla prodloužena na 21 – 28 dnů.

Tabulka 16: Porovnání infekce HSV 1 a HSV 2 u 23 pacientů

	Počet pacientů	Věk (roky) medián	Likvorový nález medián	Komorbidity (počet pacientů)	Hospitalizace (dny) medián	Průběh
HSV 1	18	33	80 elem/1 μ l	5	19 dnů	7x závažný
HSV 2	5	32	150 elem/1 μ l	0	14 dnů	

6.2.2.2. *Varicella zoster virus*

V souboru všech pacientů s aseptickou neuroinfekcí byla u 54 pacientů zjištěna neuroinfekce v průběhu infekce virem varicella zoster, což představuje 8 % všech objasněných meningitid. Likvorový nálezn u všech pacientů odpovídal aseptické meningitidě, medián počtu elementů v likvoru byl 173/1 μ l (20 – 1050), CRP bylo nízké, medián hodnoty byl 4 mg/l (1 – 47). Medián hospitalizace byl 11 dnů (7 – 30). Všichni pacienti byli léčeni aciklovirem

U 19 pacientů se neurologické komplikace rozvinuly při neštovicích, jednalo se především o děti, medián věku byl 6 let (1 – 27). Dominovala encefalitida s poruchou chůze, u nejstarší 27leté pacientky proběhla těžká forma encefalomyelitidy s poruchou sfinkterů. U 33 pacientů provázely neurologické komplikace výsev pásového oparu, medián věku byl vyšší, 55 let (2 – 83). U 11 pacientů bylo paretické postižení hlavových nervů, u 3 pacientů porucha vědomí.

Diagnostika je především na základě klinického obrazu, což znamená, že jsou na kůži přítomny typické morfy, ať už se jedná o neštovice nebo pásový opar. Metoda PCR byla použita u 12 pacientů z toho u 3 pacientů při varicele, 1x s pozitivním nálezem, u 9 pacientů při pásovém oparu, 5x s pozitivním nálezem. U 2 pacientů byl VZV identifikován metodou PCR v likvoru bez přítomného výsevu kožních morf, jednalo se o pacienty s lehčí formou meningitidy.

Žádný z pacientů s komplikací infekce VZV nebyl očkovan ani proti neštovicím ani proti pásovému oparu.

6.2.2.3. *Další herpetické viry*

Vyšetření likvoru metodou PCR k průkazu infekce EBV a CMV byl proveden u 20 pacientů. Vyšetření bylo prováděno u imunosuprimovaných pacientů nebo u pacientů s laboratorními známkami infekční mononukleózy a současně probíhající neuroinfekcí. EBV v likvoru byl prokázán u 2 pacientů. První pacient byl 71letý s chronickou lymfatickou leukémií, u kterého byla diagnostikována těžká encefalitida s ložiskovým postižením mesencefalu a pontu, nutností umělé plicní ventilace. Nejednalo se o primoinfekci, ale reaktivaci EBV. Druhý pacient byl 17 letý muž, s primoinfekcí EBV, laboratorními známkami infekční mononukleózy a meningoencefalitidou s kvalitativní poruchou vědomí, epiparoxysmem. Likvorový nálezn u obou pacientů odpovídal aseptické meningitidě s počtem elementů 30/ μ l a 110/ μ l. Hospitalizace u prvního pacienta na Klinice infekčního lékařství v Ostravě byla jeden měsíc a pacient byl přeložen k další péči na spádové anesteziologické oddělení pro nutnost

dlouhodobé umělé plicní ventilace. Druhý pacient byl hospitalizován 14 dnů. CMV v likvoru bylo prokázáno pouze u jednoho pacienta 50letého imunosuprimovaného pacienta s proktokolitidou a současně probíhající listeriovou meningitidou.

6.2.3. Chřipka

Neuroinfekce způsobená virem chřipky byla potvrzena u 3 pacientů. Jednalo o muže ve věku 33, 40 a 45 let. Všichni tři pacienti měli těžkou encefalitidu s kvalitativní poruchou vědomí. U jednoho pacienta musela být zahájena umělá plicní ventilace, přitom plicní postižení bylo minimální. Likvorový nález odpovídal aseptické meningitidě s malým počtem elementů (15 - 33/ μ l). Medián hospitalizace byl 20 dnů, delší byla u pacienta s nutností umělé plicní ventilace, který byl hospitalizován na Klinice infekčního lékařství 35 dnů a byl ještě přeložen k rehabilitaci na spádové oddělení. Žádný z našich pacientů neměl přidružené onemocnění nebo jasné známky imunosuprese. Všichni tři pacienti byli léčeni oseltamivirem.

Vyšetření likvoru metodou PCR na průkaz viru chřipky byl proveden u 12 pacientů, vždy byl současně vyšetřen i stěr z nosohltanu a také vyšetřen metodou PCR k průkazu chřipky. Jednalo se o pacienty, kteří onemocněli v době chřipkové sezóny, a současně byly přítomny známky infekce respiračního systému. Metodu PCR bylo onemocnění potvrzeno u 2 pacientů, PCR byla pozitivní z materiálu odebraného stěrem z nosohltanu, likvor byl negativní. Jednalo o virus chřipky B a virus chřipky A (H1N1)2009. Třetí pacient s chřipkovou encefalitidou měl diagnózu stanovenou sérologicky, PCR vyšetření provedeno nebylo.

Očkován nebyl ani jeden pacient.

6.2.4. Hepatitida E

Metodou PCR byl vyšetřen virus hepatitidy E v likvoru pouze u jednoho pacienta. Jednalo se o 52letého muže bez přidružených onemocnění s aseptickou meningitidou a mononeuropatií multiplex s postižením převážně brachiálního plexu. Virus hepatitidy E byl prokázán v séru i v likvoru, následně byl dourčen genotyp viru, jednalo se genotyp 3f. Důvodem k vyšetření likvoru metodou PCR byla již potvrzená hepatitida E v séru. Pacient byl hospitalizován celkem 14 dnů a nedošlo k úplné úpravě neurologického postižení. Pacient necestoval do rizikových oblastí, měl běžné stravovací návyky, konzumace nedostatečně tepelně upraveného masa si nebyl vědom.

6.2.5. Epidemická parotitida

U 14 pacientů byla potvrzena neuroinfekce v průběhu infekce virem epidemické parotitidy, což jsou 2 % všech objasněných meningitid. Medián věku byl 22 let (10 – 36), medián hospitalizace byl 7 dnů (5 – 14). Klinicky onemocnění proběhlo jako meningitida, pouze u jednoho pacienta se rozvinulo postižení vestibulárního aparátu s jednostrannou poruchou sluchu.

Diagnostika neuroinfekce spojené s infekcí virem epidemické parotitidy byla prováděna sérologicky a na základě klinického obrazu, pro který je typický otok příušních žláz. Pouze u jednoho pacienta byl virus prokázán elektronovým mikroskopem v likvoru a následně se zdařila izolace viru a byl i potvrzen metodou PCR. Jednalo se o 8letého chlapce, který měl pouze meningitidu bez parotitidy.

Očkováno bylo 8 pacientů.

6.2.6. Lymeská borrelióza

V souboru všech pacientů s aseptickou neuroinfekcí CNS borrelióza převažovala, onemocnění bylo prokázáno u 307 pacientů, což je 26 % ze všech pacientů. Medián věku byl 50 let (3 – 82), medián elementů v likvoru byl 109 /1 μ l (6 – 1000). Délka hospitalizace odpovídala antibiotické léčbě, většina pacientů měla antibiotika aplikována 14 – 21 dnů, s průměrem hospitalizace 15 dnů. Někteří pacienti dokončili antibiotickou léčbu ambulantně. Klinický průběh onemocnění u pacientů s neuroborreliózou byl závažný, u 48 % pacientů bylo přítomno ložiskové neurologické postižení hlavně paretické postižení hlavových nervů, ale i parézy končetin ať už postižení jedné či více končetin.

Většina pacientů měla onemocnění prokázáno sérologicky, PCR vyšetření bylo provedeno u 100 pacientů a pouze u 2 pacientů bylo pozitivní. Z toho jeden pacient neměl přítomny specifické protilátky, u druhého pacienta byla intrathekální tvorba protilátek přítomna. V souboru všech pacientů s borreliózou byl u 32 pacientů vyšetřen likvor i elektronovým mikroskopem s nálezem spirochet. Z toho pouze u 15 pacientů byla detekována intrathekální tvorba protilátek, u 17 pacientů protilátky detekovány nebyly. U 13 pacientů byly nalezeny spirochety a současně v likvoru byly detekovány enteroviry metodou PCR a u 13 pacientů byly v elektronovém mikroskopu viděny virové částice a PCR vyšetření na enteroviry i herpetické viry bylo negativní. Takže celkem u 26 pacientů byly zjištěny 2 agens. Interpretace

izolovaného nálezu spirochet bez protilátek je obtížná, proto pacienti s nálezem spirochet v likvoru byli léčeni antibiotiky intravenózně z diagnostických rozpaků.

6.2.7. Neurčený virus

Celkem u 17 pacientů byl elektronovou mikroskopií zachycen virus, který se nepodařilo dále určit, všechny likvory byly vyšetřeny PCR na průkaz enterovirů a HSV 1 a HSV 2 virů. Velikost virů v elektronovém mikroskopu byla 19 – 30 nm. Tvarem i velikostí odpovídaly pikornavirům. Sekvence genomu nebyla dále provedena. U 5 pacientů se jednalo o izolovaný nález, u 2 pacientů byla navíc sérologicky prokázána klíšťová encefalitida, ale velikost a tvar viru neodpovídal viru klíšťové encefalidě. U 10 pacientů byla současně prokázána borrelióza. Z uvedených 10 pacientů byla 2x borrelióza prokázána sérologicky a 8x jen v elektronovém mikroskopu nálezem spirochet. Uvedených 17 pacientů mělo klinicky lehký průběh onemocnění, který odpovídal meningitidě.

6.2.8. Další infekce

Sérologicky byla u 2 pacientů potvrzena meningoencefalitida způsobená *Mycoplasma pneumoniae*, u obou pacientů neuroinfekce navazovala na respirační infekt. Jeden pacient měl sérologicky potvrzenou infekci RSV a u jednoho imunosuprimovaného pacienta byla prokázána infekce *Toxoplasma gondii*. V diferenciální diagnostice neuroinfekcí byl likvor u 10 pacientů vyšetřen na průkaz kryptokokové infekce, u 3 pacientů byla zvažována tuberkulóza. Provedená vyšetření byla negativní. Sérologicky byla u 10 pacientů vyloučena HIV infekce, u 2 pacientů hantavirová infekce, u 5 pacientů i parvovirová infekce a u jednoho pacienta s pozitivní cestovatelskou anamnézou i malárie a dengue. Během 10letého období nebyl v souboru pacientů zaznamenán výskyt vztekliny, tetanu, poliomyelitidy ani neurologické komplikace v rámci spalniček a zarděnek.

6.2.9. Klíšťová encefalitida

Diagnostika klíšťové encefalitida byla prováděna sérologicky z krve. Onemocnění bylo prokázáno u 186 pacientů, což odpovídá 26 % ze všech objasněných etiologií meningitid. Medián věku byl 36 let (2 – 84), medián hospitalizace byl 11 dnů (7 – 30). U 3 pacientů proběhla bulbární encefalitida, z toho 1 pacient zemřel, u 2 pacientů zůstala po onemocnění kvadruparéza. U dalších 4 pacientů se po onemocnění rozvinuly paretické komplikace a u 1 pacienta postižení sluchu. Žádný z uvedených pacientů nebyl očkován.

6.2.10. Porovnání přínosu jednotlivých metod v diagnostice aseptických neuroinfekcí

Klinické porovnání aseptických neuroinfekcí je shrnuto v tabulce 17. Potenciálně preventabilní původci vakcinací způsobili onemocnění u 257 pacientů, což je 22 % ze všech aseptických neuroinfekcí. V diagnostice etiologie bylo kombinováno vždy několik metod současně, pouze sérologicky byla etiologie objasněna u 496 pacientů, což je 70 % ze všech objasněných meningitid a 42 % ze všech pacientů. Sérologické metody jsou nejpřínosnější v diagnostice klíšťové encefalitidy a borreliózy. Molekulárně genetické metody byly pozitivní u 144 pacientů, což je 20 % ze všech objasněných meningitid a 12 % ze všech pacientů. Z toho u 123 pacientů byla PCR jediná metoda, která určila etiologii onemocnění. U 4 pacientů bylo pozitivní i sérologické vyšetření, z toho se jednalo o jednoho pacienta s borreliózou, jednoho pacienta s primoinfekcí HSV 1, EBV infekcí a pacienta s virovou hepatitidou E. U 17 pacientů byl současně pozitivní nález v EM a virus byl i vykultivován a PCR vyšetřením byly potvrzena enteroviry u 16 pacientů a u jednoho pacienta infekce virem epidemické parotitidy. EM izolovaně potvrdila onemocnění u 34 pacientů, z toho u 17 pacientů se virus nepodařilo dále určit a u 17 pacientů se jednalo o pozitivní nález spirochet bez protilátkové odpovědi. Pouze na základě klinického obraz byla diagnóza stanovena u pacientů s pásovým oparem a neštovicemi, jednalo se o 46 pacientů (Tabulka 18, Graf 8).

Tabulka 17: Porovnání aseptických neuroinfekcí vybraných původců u 709 pacientů

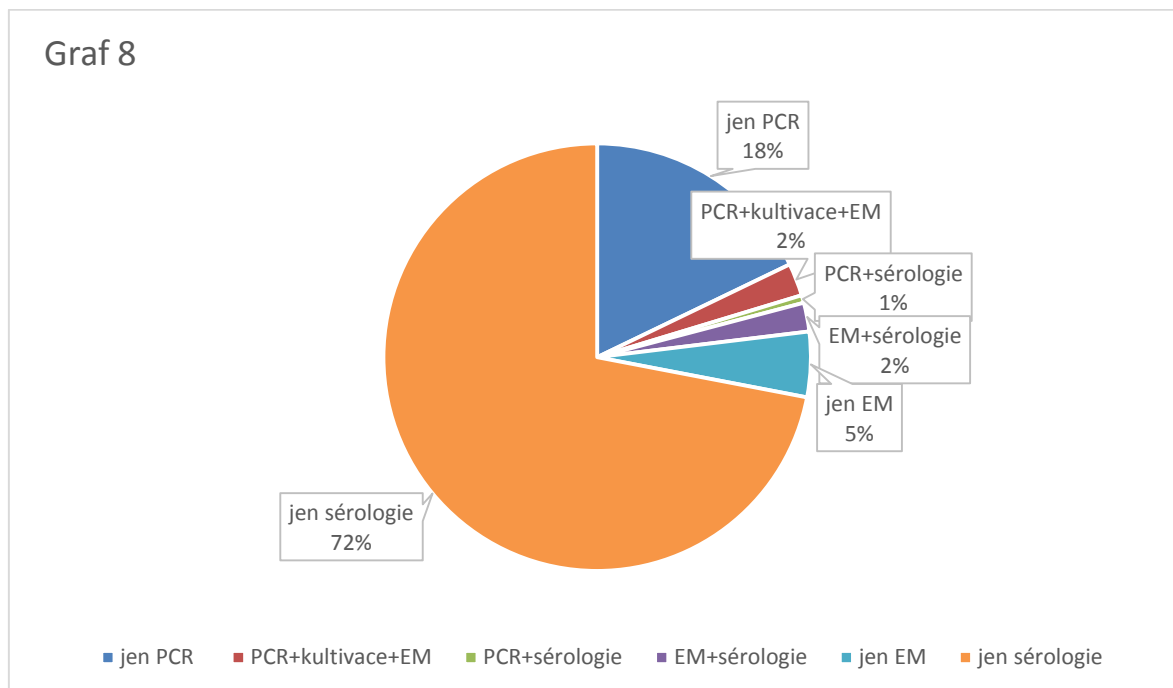
Původce	Počet pacientů	Věk (roky) medián	Hospitalizace (dny) medián	Komplikace (počet pacientů)	Úmrtí (počet pacientů)
Enteroviry	122	15	8	6 (5 %)	-
HSV 1,2	23	36	15	7 (30%)	1
VZV	54	27	11	25 (46 %)	-
KE	186	36	11	8 (4 %)	1
Borrelióza	307	50	15	177 (48 %)	-
Epid.parotitida	14	22	7	1	-
Chřipka	3	40	20	3	-
Celkem	709	32 p<0,0001	12 p<0,0001	227	2

Signifikatní jsou jak rozdíly ve věku pacientů i době hospitalizace. Významné jsou hlavně rozdíly v době hospitalizace pacientů s enterovirovou infekcí a KE ($p=0,000316$), borreliózou ($p=0,0001$), VZV ($p=0,031254$) a HSV ($p=0,005887$).

Tabulka 18: Diagnostika aseptických neuroinfekcí

Metoda	PCR	Sérologie	EM	Izolační pokus	Klinický obraz
Původce					
Enteroviry	104	18	16	16	-
HSV 1,2	23	1	-	-	-
VZV	8	-	-	-	52
EBV	2	1	-	-	-
CMV	1	-	-	-	-
KE	-	186	-	-	-
Borrelióza	2	289	32	-	-
Epi. parotitida	1	13	1	1	-
Chřipka	2	1	-	-	-
VHE	1	1			

Graf 8: Přínos jednotlivých diagnostických metod v diagnostice aseptických neuroinfekcí u 705 pacientů



7. DISKUZE

7.1. PURULENTNÍ MENINGITIDY

Bakteriální meningitidy jsou závažná onemocnění s vysokou smrtností a četnými následky, jak je zřejmé i z našeho souboru. Jedná se heterogenní skupinu původců onemocnění, přesto celosvětově převažují hemofilové, pneumokokové a meningokokové meningitidy, stejně jako v našem souboru pacientů (*Castelblanco RL. et al., 2014; Džupová O. et al., 2010; Pellegrino P. et al., 2014*). Průměrná letalita purulentních meningitid se pohybuje v rozmezí 15 – 20 %, u meningokokové a hemofilové meningitidy nepřekračuje 10 %, u pneumokokové meningitidy je vyšší, pohybuje se v rozmezí 18 – 40 % (*Thigpen MC. et al., 2011; Džupová O. et al., 2009*). Vzhledem k závažnosti onemocnění je velká pozornost věnována preventivním opatřením. Vakcinace výrazným způsobem ovlivnila epidemiologii purulentních meningitid. Zavedením vakcinace proti hemofilům, pneumokokům a meningokokům v USA došlo k poklesu incidence všech meningitid za 19leté období (1993-2011) o 21 % a změně spektra původců, uvedení původci na začátku sledování vyvolali 41 % onemocnění, v roce 2011 způsobili jen 24 % všech meningitid (*Pellegrino P. et al., 2014*). Změna spektra původců a zavedení vakcinace do rutinní praxe klade větší důraz na diagnostiku, která slouží k posouzení efektu preventivních opatření.

V prevenci invazivních pneumokokových onemocnění (IPO) byla od 80. let k dispozici polysacharidová 23valentní pneumokoková vakcína, vzhledem k nemožnosti použít tuto vakcínu u dětí do 2 let byl vývoj směřován ke konjugovaným vakcínám. V USA byla vakcinace konjugovanou 7valentní vakcínou k dispozici od roku 2000 a následně došlo k poklesu incidence vakcinačních kmenů pneumokokových meningitid ve všech věkových skupinách o 92 % a u dětí mladších než 2 roky poklesla incidence všech pneumokokových meningitid o 62 % (*McIntyre PB. et al., 2012*). V ČR byla od roku 2005 k dispozici 7valentní konjugovaná vakcína, od roku 2009 přistoupila 10valentní konjugovaná vakcína a v roce 2010 byla 7valentní vakcína nahrazena 13valentní konjugovanou vakcínou, kterou je nyní možno aplikovat bez věkového omezení. Od roku 2007 byla hrazená vakcinace pro rizikové děti, od roku 2010 pro všechny narozené děti. V ČR došlo k poklesu IPO ve skupině dětí do 1 roku z 15/100 000 v roce 2000 na 1,8/100 000 v roce 2012. Nový vzestup na 9,2/100 000 byl pozorován v roce 2013, který byl vysvětlován poklesem proočkování dětské populace

(Vacková Z. et al., 2013). V dospělé populaci zatím výskyt IPO nebyl ovlivněn (Vacková Z. et al., 2013). Také v našem souboru pacientů dominovali spíše dospělí pacienti.

Diagnostika je nutná k jak surveillance onemocnění tak k sledování efektu vakcinace, PCR představuje výhodu identifikovat původce i po zahájené antibiotické terapie (Van Gastel E. et al., 2007). Značný počet pacientů v době odběru materiálu na mikrobiologické vyšetření má již zahájenou antibiotickou léčbu, například ve Španělsku byla etiologie pouze pomocí PCR stanovena u 66 % pacientů (Selva L. et al., 2012). V ČR v roce 2013 ze všech 335 IPO bylo pouze 7 onemocnění potvrzeno metodou PCR a stejný trend trvá i roce 2014 (Kozáková J. et al. 2014), což může svědčit o malém využití této metody v běžné klinické praxi. Metoda PCR se v případě pneumokoků vyznačuje vysokou senzitivitou, v rozmezí 92–100 %, i specificitou, 96–100 % (Van Gastel E. et al., 2007). Metodou PCR lze stanovit nejen přítomnost pneumokoka v biologickém materiálu, ale také sérotyp (Harrison OB. et al., 2011; Vacková Z. et al., 2013). Hlavní význam stanovení sérotypů spočívá v posouzení efektu vakcinace a možného replacementu vakcinačních kmenů jinými sérotypy. Ve sledovaném souboru pacientů s pneumokokovou meningitidou metoda PCR byla výrazným přínosem v diagnostice, nebyl zaznamenán jediný falešně negativní výsledek a u 31 % pacientů bylo PCR jediným vyšetřením, kterým se podařilo etiologii onemocnění určit. Teoretická prevence dostupnými vakcínami v našem souboru představuje téměř 80 % všech meningitid. Závažnost onemocnění a na druhou stranu možnost prevence je argumentem pro podporování vakcinace starších osob. Dle doporučení České vakcinologické společnosti ČLS JEP je očkování vhodné pro všechny osoby starší 65 let a pro osoby mladší, pokud mají přítomný jakýkoliv rizikový faktor pro rozvoj IPO. Mezi rizikové faktory patří kuřáctví, vrozené nebo získaná imunodeficience, asplenie, onemocnění krvevotvorby, HIV infekce, nádorová onemocnění, chronické onemocnění srdce, plic, diabetes mellitus, jaterní cirhóza, přítomnost likvorei nebo kochleární implantát (Chlíbek R. et al., 2014). Uvedené chronické onemocnění zvyšují riziko IPO až 10x (Kyaw MH. et al., 2005). Pro očkování dospělých jsou schváleny 2 vakcíny 23valentní polysacharidová a 13valentní konjugovaná, vzhledem k imunogenitě vakcín je vhodné zahajovat očkování konjugovanou vakcínou (Chlíbek R. et al., 2014). Ve sledovaném souboru byla očkována pouze jedna pacientka s výraznou imunosupresí, jednalo se o dívku po transplantaci jater. Pacientka byla očkována polysacharidovou vakcínou a prodělala onemocnění způsobené preventabilním sérotypem obsaženým v polysacharidové vakcíně. Udaná kazuistika svědčí o nedostatečné imunogenitě polysacharidové vakcíny u imunosuprimovaných osob a je dalším argumentem k očkování konjugovanými vakcínami.

Meningokokové meningitidy se vyskytují především u kojenců a adolescentů, o čemž svědčí i náš sledovaný soubor pacientů. Smrtnost meningitid je menší než meningokokových sepsí, také v našem souboru pacientů zemřel jen jeden pacient (Rožnovský L. et al., 2013; Křížová P. and Rožnovský L., 2011). Po meningokokovém onemocnění se mohou rozvinout závažné komplikace hlavně neurologické postižení, postižení sluchu a kožní defekty s nutností chirurgického řešení (Křížová P. a Rožnovský L., 2011). Vakcinace představuje účinnou prevenci onemocnění. Polysacharidové vakcíny se objevily v 80. letech, v 90. letech následovaly konjugované vakcíny proti *Neisseria meningitidis* typu C a v polovině 1. dekády 21. století přistoupila tetravalentní konjugovaná vakcína (séroskupiny A, C, Y, W-135). V USA byla tetravalentní vakcína doporučena pro vakcinaci adolescentů v roce 2005 a vedla k poklesu výskytu meningokokových meningitid (Pellegrino P. et al., 2014). V ČR byla uvedená vakcína k dispozici od roku 2010, ale vzhledem k malé proočkovánosti a epidemiologické situaci s převahou séroskupiny B se incidence onemocnění zatím nezměnila (Křížová P. et al., 2013). Vakcína proti séroskupině B je v ČR k dispozici od roku 2014, užití této vakcíny je doporučováno pro nejrizikovější skupiny kojenců a adolescentů (Doporučení ČVS., 2014) Je možné očekávat, že její širší užití povede k poklesu incidence meningokokových onemocnění. Etiologická diagnostika meningokokových onemocnění je důležitá k surveillanci invazivních meningokokových onemocnění. Výsledek kultivačního vyšetření je závislý hlavně na tom, zda odběr biologického materiálu byl proveden před zahájením antibiotické terapie. Pozitivní hemokultura před podáním antibiotik je u 50 % pacientů, po podání antibiotik je pozitivní výsledek pouze u 5 % pacientů, k výrazné redukci dojde i v případě vyšetření likvoru (Bronská E. et al., 2005). Včasně podaná antibiotika v přednemocniční péči mají vliv na prognózu onemocnění. V ČR existuje doporučení, které zahrnuje rychlé podání antibiotik v přednemocniční péči, tak i odběr biologického materiálu před podáním antibiotik (Rožnovský L. et al., 2013). Vzhledem k závažnosti onemocnění, nutnosti zajistit základní životní funkce, není vždy odběr materiálu adekvátně proveden. PCR diagnostika představuje velký přínos v diagnostice invazivních meningokokových onemocnění, zvláště proto, že umožňuje stanovit původce i po zahájení antibiotické terapie (Mackay IM., 2004; Hrabák J. et al., 2010; Harrison OB. et al., 2011; Van Gastel E. et al., 2007; Shin SY. et al., 2012). PCR vyšetření lze provést z krve, likvoru, eventuálně i z petechií, které jsou přítomny na kůži. Pomocí PCR vyšetření lze stanovit i séroskupinu, která onemocnění způsobila. V roce 2012 a 2013 bylo v ČR metodou PCR potvrzeno 62,5 % a 49,1 % onemocnění, z toho u 28,1 %, resp. 25,4 % byla PCR jedinou metodou, která onemocnění diagnostikovala (Křížová P. et al., 2014). Ve studii pražských autorů PCR metoda potvrdila

diagnózu jako jediná u 26 % pacientů (*Bronská E. et al., 2005*). V souboru našich pacientů byla PCR jediná metoda s pozitivním záchytem meningokoka u 39 % pacientů a u 3 pacientů se jednalo o izolovaný nálezn v petechiích, také nebyl zaznamenán žádný falešně negativní výsledek. Senzitivita PCR vyšetření v případě meningokokových onemocnění se pohybuje v rozmezí 96–98,5 % a specifita dosahuje 96–100% (*Van Gastel E. et al., 2007*). Teoretické pokrytí dostupnými vakcínami v našem souboru dosahovala až 90 % všech meningokokových onemocnění. Další výhodou PCR diagnostiky představuje rychlost, výsledek vyšetření je k dispozici během několika hodin, což umožňuje rychlé opatření u rizikových kontaktů nemocného, u kterých je nutné preventivní zahájení léčby antibiotiky a u konkrétního pacienta umožní deeskalaci antibiotické terapie.

V případě hemofilových meningitid je situace příznivá. *Haemophilus influenzae* typ b je nejčastějším původce invazivních onemocnění malých dětí a v důsledku vakcinace došlo k výrazné redukci onemocnění (*Lebedová V. et al., 2014*). V ČR byla rutinní vakcinace zahájena v červenci 2001. Před zavedením vakcinace bylo v ČR hlášeno průměrně 100 onemocnění Hib za rok, v roce 2013 nebylo hlášeno žádné onemocnění (*Lebedová V. et al., 2013*). K posouzení efektu vakcinace je nutná další surveillance invazivních hemofilových onemocnění. Sledování souboru našich pacientů bylo zahájeno v roce 2004, hemofilová meningitida byla diagnostikována jen u 12 pacientů a z toho u 7 pacientů byl potvrzen sérotyp b. U jedné pacientky se jednalo o selhání vakcinace. V celé ČR bylo za období 2001 – 2013 hlášeno 14 jasných případů selhání vakcinace (*Lebedová V. et al., 2013*). Pomocí metody PCR bylo stanoveno v našem souboru onemocnění u 3 pacientů (25 %), u 2 pacientů bylo PCR vyšetření negativní, protože metoda nebyla schopna ještě detekovat non b sérotypy, k úpravě metodiky došlo v roce 2010. Po roce 2010 nebyl zaznamenán falešně negativní výsledek. PCR metody k detekci hemofilových onemocnění by měly být schopny detekovat i non b sérotypy (*Harrison OB. et al., 2011*). Důslednou diagnostikou je možné sledovat, zda nedochází k replacementu sérotypu b jiným nevakcinačním sérotypem, což zatím v ČR, ani jinde ve světě nebylo zaznamenáno (*Lebedová V. et al., 2013; Thigpen MC. et al., 2011; Heath PT., 1998*).

Listeriové meningitidy patří mezi 3. nejčastější komunitní meningitidy v současnosti, i v souboru našich pacientů se jednalo o 3. nejčastějšího původce meningitid (*Džupová O. et al., 2013; Amaya-Villar R. et al., 2010*). Vysvětlením je změna spektra původců v rozvinutých zemích v důsledku vakcinace hlavně dětské populace. Pro listeriózu je typická manifestace onemocnění v novorozeneckém věku a u imunosuprimovaných pacientů.

Imunokompromitovaní pacienti tvoří většinou více než polovinu nemocných, stejně jako pacienti v našem souboru (Džupová O. et al., 2013; Amaya-Villar R. et al. 2010; Brouwer MC. et al., 2006). Popsána jsou však i závažně probíhající onemocnění pacientů bez zjevných defektů imunity a onemocnění dětí (Ben Shimol S. et al., 2012; O'Callaghan M. et al., 2012). Včasná detekce listerií je zásadní pro správnou volbu antibiotik, ampicilin, který je lékem volby, nemusí být součástí vstupní antibiotické terapie, v souboru nizozemských autorů až 30 % nemělo v úvodu onemocnění adekvátní terapii (Brouwer MC. et al., 2006). PCR vyšetření, které je schopno stanovit diagnózu během několika hodin, nebývá rutinně součástí vyšetřovacího setu v diagnostice meningitid, na našem pracovišti je listerióza pomocí PCR vyšetřována od roku 2006. V práci italských autorů je *Listeria monocytogenes* současně diagnostikovaná kultivací i PCR vyšetřením, PCR metoda navíc objasnila 22 % listeriových meningitid, v souboru francouzských autorů byla listerióza diagnostikována navíc až u 50 % kultivačně negativních vzorků (Favaro M. et al., 2013; Le Monnier A. et al., 2011). V našem souboru pacientů objasnila metoda PCR navíc 40 % onemocnění, zaznamenali jsme jeden falešně negativní výsledek. V současnosti na našem pracovišti u imunokompromitovaných pacientů je ampicilin vždy součástí vstupní antibiotické terapie a je vysazován až po dokončení kultivace. Také v našem souboru pacientů byla zaznamenána listeriová meningitida u 8letého dítěte, proto ampicilin je podáván i jako vstupní léčbu purulentních meningitid u dětí, které jsou řádně očkovány. Po stanovení diagnózy je léčba deeskalována.

PCR vyšetření meningitid, které zahrnuje 4 základní patogeny *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* a *Listeria monocytogenes* se jeví jako dostatečné. Uvedení původci způsobili onemocnění u 148 pacientů (73 %), PCR likvoru, petechií, kloubního punktátu a hemokultury bylo provedeno u 101 pacientů s pozitivním nálezem u 100 pacientů. PCR metoda jako jediná prokázala původce u 51 pacientů, což představuje 25 % všech meningitid, u kterých se původce podařilo určit. Vzhledem k uvedeným výsledkům považujeme používání PCR vyšetření v rutinní praxi za opodstatněné. Značná variabilita původců a dosud nemožnost metodou PCR stanovit citlivost na antibiotika vyžaduje i současné používání klasických kultivačních metod. V našem souboru pacientů s purulentní meningitidou nadále dominují pneumokokové meningitidy u dospělých a meningokoková meningitida u dětí a u adolescentů. Výhledově může vakcinace ovlivnit i onemocnění u této skupiny pacientů.

7.2. ASEPTICKÉ MENINGITIDY

Aseptické neuroinfekce mají velký rozptyl klinických příznaků od nezávažných meningitid, které probíhají pod obrazem tzv. letní chřipky až po závažné encefalitidy s rozvojem trvalých následků a úmrtím. Stejně tak i v našem souboru pacientů většina měla průběh nezávažný s klinickým obrazem meningitidy, nejčastější komplikací bylo rozvoj paretického postižení. Smrtnost onemocnění je malá z 1180 nemocných jen 5 pacientů, což není ani 0,5 %, zemřelo. V souborech pacientů s aseptickými neuroinfekcemi se pohybuje etiologická objasněnost kolem 70 %, studie z Norska uvádí určení etiologie až u 90 % pacientů, ve Švédsku se pohybuje etiologická objasněnost kolem 70 % ale např. v Polsku je to jen kolem 17 % (*Stefanoff P. et al., 2011; Ambrose HE. et al., 2011; Thompson C. et al., 2012; Tveitnes D. et al., 2012; Franzen-Rohl E. et al., 2008*). V souboru našich pacientů se podařilo kombinací více diagnostických metod objasnit etiologii u 60 % pacientů, přitom v roce 2013 objasněnost přesáhla 80 %. Logicky vzhledem k závažnějším průběhům je velká pozornost věnována akutním encefalitidám, i když v publikovaných studiích se liší definicí onemocnění i použitými diagnostickými metodami (*Jmor F. et al., 2008*). Incidence onemocnění se pohybuje u dětí od 2,5 - 10/100 000, u dospělých 8,0 - 2,0/100 000, rozdílná incidence onemocnění je ovlivněna hlavně regionálními rozdíly (*Jmor F. et al., 2008; Koskiniemi M. a Vaheiri M., 1989; Granerod J. et al., 2013*). Geografické souvislosti hrají zásadní roli ve výskytu arboviróz. Smrtnost encefalitid je uváděna v rozsahu od 3 % - 7,4 % případů (*Koskiniemi M. a Vaheiri M., 1989; Trevejo RT., 2004; Mailles A. et al., 2007*). Nejčastější původci aseptických meningitid jsou enteroviry (*Lee BE. a Davies HD., 2007; Stellrecht KA. et al., 2002*). Nejčastějšími původci encefalitid jsou arboviry, HSV 1, VZV. Na začátku pandemie HIV se uplatňoval i tento virus jako častý původce encefalitid, působil až 15 % objasněných encefalitid v USA (*Jmor F. et al., 2008; Khetsuriani N. et al., 2002; Koskiniemi M. a Vaheiri M., 1989; Granerod J. et al., 2010*). V důsledku dobré epidemiologické situace a očkování došlo v rozvinutých zemích k výrazné změně v etiologii encefalitid, v běžné klinické praxi nejsou diagnostikovány encefalitidy způsobené virem spalniček, příušnic, zarděnek, vztekliny. Například ve Finsku byla srovnána incidence onemocnění před zavedením vakcinace a po zavedení vakcinace, redukce byla v dětské populaci z 19,8/100 000 na 2,5/100 000 (*Koskiniemi M. a Vaheiri M., 1989*). Cílená terapie v případě aseptických neuroinfekcí je k dispozici pouze pro herpetické viry a borreliózu. Dobrá diagnostika umožňuje správně volit terapii, sledovat výskyt jednotlivých onemocnění, hodnotit efekt vakcinace, posoudit závažnost onemocnění ve vztahu k etiologickému agens a zvažovat

vakcinaci rizikových skupin. V diferenciální diagnostice je nutno zvažovat i autoimunitní postižení CNS, které v úvodu onemocnění je často nerozeznatelné od onemocnění způsobených infekčními agens. V souboru 203 sledovaných pacientů byla autoimunitní encefalitida potvrzena u 21 % pacientů, u 42 % pacientů se jednalo o infekční příčinu onemocnění a 37 % pacientů etiologii objasněnou nemělo (*Granerod J. et al., 2010*).

Enteroviry patří mezi nejčastější původce meningitid (*Lee BE. a Davies HD., 2007; Stellrecht KA. et al. 2002*). Možnost diagnostikovat enteroviry metodou PCR jsme měli od roku 2006, z celkového počtu 1180 pacientů způsobily onemocnění u 122 pacientů (10 %), což je téměř ve shodě s americkou studií z roku 2002, z celkového počtu pacientů 1056 mělo enteroviry metodou PCR potvrzeno 11 % pacientů (*Stellrecht KA. et al., 2002*). PCR diagnostika byla nejprínosnější v diagnostice onemocnění, výsledek byl k dispozici během 24 hodin a významnou měrou se podílel na redukci antibiotické terapie. Sérologická diagnostika je k dispozici se zpožděním, je nutné vyšetřit párové séra, vede k prodloužení hospitalizaci a delšímu neadekvátnímu podávání antibiotik. Podobné zkušenosti jsou i ve studii francouzských autorů, dostupnost PCR diagnostiky enterovirů snižovala indikaci zbytečné antibiotické léčby a umožňovala použití pouze symptomatické terapie. Pokud již byla antibiotická terapie nasazena, bylo možné její včasné ukončení, což omezuje spotřebu antibiotik a má sekundárně vliv na rozvoje antibiotické rezistence i postantibiotických komplikací (*Peigue-Lafeuille H. et al., 2006; Archimbaud C. et al., 2009; Lee BE. a Davies HD., 2007*). Použití PCR metod a hlavně rychlá dostupnost výsledku výrazně redukuje počet dalších nutných vyšetření u pacienta a zkracuje dobu hospitalizace, francouzští autoři uvádějí průměrnou dobu hospitalizace u potvrzených enterovirových meningitid u dětí pouze 2 hodiny a 35 minut, 95 % pacientů bylo možno propustit do ambulantní péče během 24 hodin (*Archimbaud C. et al., 2009*). V českých podmínkách je takto krátká doba hospitalizace nepředstavitelná, ale stejně pacienti s potvrzenou enterovirovou meningitidou byli hospitalizováni 8 dnů (6–20 dnů). Jednalo hned po parotických meningitidách o druhou nejkratší dobu hospitalizace. Vzhledem k dobré epidemiologické situaci, nejsou v ČR diagnostikovány enterovirové infekce způsobené polio virem, ČR patří mezi polio-free země, přesto při výskytu chabých paréz u dětí je nutno na poliomyelitidu myslet a provést hlášení a vyšetření viru ze stolice (*Částková J. a Králová R., 2009*). V současnosti je velká pozornost enterovirům, které jsou označovány jako polio-like viry, v roce 2014 enterovirus D-68 způsobil epidemii respiračních infekcí s rozvojem chabých paréz. Bylo zaznamenáno více jak 90 onemocnění a 11 dětí zemřelo (*Špliňo M. a Chlíbek R., 2015*). Podobně závažný průběh

byl zaznamenán i ve spojitosti s virem C-105 (*CDC report., 2015*). V naší práci jsme zaznamenali pouze parézu lícního nervu způsobenou virem Coxsackie B4, u jednoho pacienta dysartrii a 4 pacientů kvalitativní poruchu vědomí. Podrobnější určení enterovirů nebylo prováděno, přichází do úvahy sekvenace genomu jako v práci plzeňských autorů, kteří prokázali jako nejčastější původce meningitid v našich podmínkách ECHO viry (*Rainetová P. et al., 2015*).

Herpetických neuroinfekce jsou závažné svým průběhem, patří mezi časté původce encefalitid (*Davison KL. et al., 2003; Granerod J. et al., 2010; Čížman M. a Jazbec J., 1993; Kupila L. et al., 2006*). Výhodou je u většiny herpetických virů dostupnost cílené terapie. Sérologická diagnostika je průkazná pouze v případě primoinfekce, v případě reaktivace viru není většinou dostatečně specifická a navíc se protilátková odpověď zpožďuje za klinickým obrazem onemocnění. K potvrzení diagnózy je nutné vyšetření párového séra s odstupem nejméně 10–14 dnů. PCR diagnostika umožní diagnostikovat infekci během několika hodin a pacient může být adekvátně léčen. Závažnější postižení vzniká během infekce virem HSV 1 než virem HSV 2 (*Kupila L. et al., 2006; Miller S. et al., 2013*). Stejně tak i v souboru našich pacientů se v průběhu infekce HSV 2 nerozvinuly závažnější komplikace. Aciklovir představuje lék volby, všichni pacienti s infekcí HSV 1 i HSV 2 byli cíleně léčeni. Včasná a cílená terapie je prevencí těžkých forem onemocnění (*Thompson C. et al., 2012; Davis LE., 2008*). Přesto jsou v literatuře publikované retrospektivní studie, které prokázaly v likvoru přítomnost herpetických virů, pacienti nebyli cíleně léčeni a k rozvoji neurologického postižení nedošlo. Jednalo se však většinou o pacienty bez imunodeficitu. Vysvětlením je pouhá reaktivace viru často v souvislosti s jiným onemocněním například klíšťovou encefalitidou nebo enterovirovou meningitidou (*Labská K. et al., 2015; Noska A. et al., 2015*). Stejně tak i v našem souboru jsme během probíhající neuroborreliózy zaznamenali 2x pozitivní PCR herpetických virů, přesto, že se klinicky jednalo o meningitidu, byli pacienti léčeni i antivirotiky. Další duální infekce v likvoru, CMV virus a *Listeria monocytogenes*, byla zachycena u pacienta s proktokolitidou, podobná kazuistika je popsána i v literatuře, u imunosuprimovaného pacienta je doporučované podat cílenou léčbu na obě agens (*Santos-Antunes J. et al., 2014*). V úvahu je třeba také vzít, že až 15 % pacientů s HSV infekcí, zvláště imunokompromitovaných, může mít první vyšetření negativní (*Thompson C. et al., 2012*). Podobná zkušenost byla zaznamenána i v našem souboru pacientů, u jednoho výrazně imunosuprimovaného pacienta bylo PCR HSV 1 pozitivní až z 2. lumbální punkce, pacient byl léčen aciklovirem a léčba při 1. negativním výsledku vysazena nebyla.

Z herpetických virů je dostupná vakcinace pouze na VZV virus a to jak na primoinfekci i reaktivaci herpes zoster. Neuroinfekce je komplikací infekce VZV, jedná se často o závažné meningoencefalitidy i polyradikuloneuritidy, jak dokladuje i soubor našich pacientů, v literatuře jsou popsána i úmrtí (*Granerod J. et al., 2010; Mailles A. et al., 2007; Koskiniemi M. a Vaheri M., 1989*). Incidence neurologických komplikací je uváděna 1:1000 varicelových infekcí, postižení vzniká kombinací přímého působení viru i imunitně zprostředkovaných mechanismů. Pro tuto verzi svědčí i to, že v průběhu neštovic je virus méně často zachycen v likvoru na rozdíl od probíhajícího pásového oparu (*Persson A. et al., 2009*). Na druhou stranu může být pozitivní PCR i bez přítomných typických kožních eflorescencí, v našem souboru se jednalo jen o 3 pacienty, ale jsou popsány studie, kde až polovina pacientů s pozitivním nálezem PCR VZV v likvoru neměla na kůži výsev typických morf (*Choi R. et al., 2014*). Uvedená skutečnost je jistě ovlivněna množstvím indikací přímého průkazu VZV. V současnosti je velká pozornost věnována vaskulopatiím v souvislosti s VZV reaktivací. Je uváděno, že jen 2/3 pacientů mají pozitivní likvorový nález ve smyslu pleiocytózy a přesto může dojít i závažnému neurologickému postižení, jsou popsána ischemická i hemoragická ložiska, vznik aneurysmat (*Choi R. et al., 2014; Gilden D. et al., 2009*). Léčba aciklovirem i kortikoidy je v případě neuroinfekce v souvislosti s VZV infekcí všeobecně doporučována (*Choi R. et al., 2014; Persson A. et al. 2009; Granerod J. et al., 2010; Gilden D. et al., 2009*).

EBV je raritním původcem zánětu CNS, přesto jsou v literatuře popsána kazuistická sdělení EBV infekce jako etiologického agens neuroinfekce se závažným postižením sluchu nebo polyradikuloneuritidy (*Hottenrott T. et al., 2013*). I v souboru našich pacientů bylo zachyceno u 2 pacientů toto agens a lze předpokládat, že EBV byl původcem onemocnění. Samozřejmě v případě pozitivních nálezů je v diferenciální diagnostice zvažována i reaktivace viru. Ve studiích, kde byla k diagnostice užita multiplex PCR k detekci více agens současně, byl EBV prokázán současně vždy s jiným původcem onemocnění (*Shin SY. et al., 2012; Del Prete R. et al., 2009*).

V době chřipkové sezóny je vhodné u pacientů se současně probíhajícím respiračním infektem a neuroinfekcí zvažovat chřipku jako etiologické agens. V průběhu prakticky všech chřipkových epidemií jsou popisovány encefalitidy, většinou jsou svázány s epidemiemi vyvolanými chřipkou A. Během poslední pandemie způsobené virem chřipky A (H1N1) 2009 byly popsány akutní hemoragické encefalitidy, případně encefalitida s akutním refrakterním edémem mozku (*Akins PT. et al., 2010*). Virus chřipky B způsobuje neurologické postižení vzácněji, zejména u dětí, většinou jsou v literatuře uváděny pouze jednotlivé kazuistiky

(Newland JG. et al., 2003, Petroušová L. et al., 2013). V patogenezi postižení centrálního nervového systému virem chřipky se uplatňuje více faktorů, zejména přímé působení viru a současně imunopatologické procesy s uvolněním prozánětlivých cytokinů (Akins PT. et al., 2010). Metodou PCR je možno virus prokázat na sliznicích dýchacího traktu nebo méně často v likvoru (Petroušová L. et al., 2013). Včasně prokázána infekce umožní cílenou protivirovou terapii. V našem souboru se podařilo potvrdit chřipku u 3 pacientů, u dvou pomocí PCR s pozitivním nálezem na sliznicích a u jednoho sérologicky. Průběh onemocnění byl závažný, u 2 pacientů s nutností umělé plicní ventilace. Právě tyto případy onemocnění potvrzují důležitost vakcinace.

V diagnostice epidemické parotitidy se uplatňují hlavně sérologické metody. Virus příušnic lze prokázat také metodou PCR v likvoru nebo slinách nemocného (Limberková R. a Lexová P., 2014). Navíc některé encefalitidy probíhají bez otoků příušních žláz, ve sledovaném souboru byl zaznamenán uvedený průběh u jednoho pacienta. Význam je hlavně epidemiologický, umožňuje sledovat efekt vakcinace, průlomové infekce, jejich závažnost u očkovaných a neočkovaných, posouzení výhodnosti vakcinačních schémat a ev. vhodnost dalšího přeočkování populace.

Neurologické postižení v průběhu hepatitidy E patří mezi nejčastější extrahepatální manifestaci onemocnění, rozvine se u 2 – 5 % pacientů (Wedemeyer H. et al., 2012). Rozvoj neurologických komplikací je spojen jak s akutní, tak s chronickou hepatitidou E, která je popisována u imunosuprimovaných osob (Kamar N. et al., 2015). Průkaz viru je možný kombinací sérologického vyšetření i přímého průkazu viru v séru, stolici nebo likvoru. Detekce viru v likvoru je častější u pacientů imunokompromitovaných s chronickou hepatitidou E než u pacientů imunokompetentních s akutní hepatitidou E (Kamar N. et al., 2011). V souboru našich pacientů se podařilo prokázat virus hepatitidy E v likvoru i v séru u imunokompetentního pacienta s autochtonní získanou hepatitidou E (Petroušová L. et al., 2015).

Sérologická diagnostika se uplatňuje v diagnostice klíšťové encefalitidy a lymeské borreliózy. V souboru našich pacientů byla klíšťová encefalitida prokázána u 16 % všech pacientů, všechny onemocnění byly potvrzeny sérologicky. Diagnostika borreliózy je problematictější, v našem souboru jsme onemocnění prokázali u 26 % pacientů. Dle doporučení České infektologické společnosti je pro diagnostiku neuroborreliózy nejdůležitější průkaz intrathekální syntézy protilátek, přímé metody jsou pouze doplňující (Dlouhý P. et al., 2011). PCR diagnostika neuroborreliózy má nízkou senzitivitu, u časných neuroborreliózy se pozitivní

výsledky prokazují u 10 – 30 % pacientů, i když jsou prezentovány i práce, kde pozitivita PCR u časné formy neuroborreliózy dosahuje až 60 % (Mygland A. et al., 2010; Wilske B. et al., 2007; Pícha D. et al., 2005). V doporučeních se zmiňuje zástinová mikroskopie, eventuálně pro výzkumné účely i elektronová mikroskopie (Dlouhý P. et al., 2011). Přímá detekce borrelií v likvoru může mít význam hlavně v časné fázi infekce, do 6 týdnů od začátku onemocnění, kdy protilátky ještě nemusí být vytvořeny (Mygland A. et al., 2010; Schwarzová K. et al., 2009). V práci českých autorů 18 % pacientů mělo pozitivní pouze PCR bez přítomnosti specifických protilátek, v práci polských autorů až 56 % pacientů mělo pozitivní PCR vyšetření bez průkazu specifických protilátek (Pícha D. et al., 2005; Chmielewski T. et al., 2003). V naší práci se podařilo zachytit *Borrelia burgdorferi* metodou PCR pouze u 2 pacientů, ale jeden měl negativní protilátky v séru i likvoru. V rámci grantové studie byly 2 roky likvory vyšetřovány i elektronovou mikroskopií s poměrně častým nálezem spirochet bez adekvátní protilátkové odpovědi. PCR vyšetření při pozitivním nález spirochet EM byla negativní (Petroušová L. et al., 2013). Bylo prováděno i imunoelektronové vyšetření spirochet s pozitivním nálezem. Diagnostika borreliózy pomocí mikroskopie byla použita např. v souboru pacientů s kožními změnami, EM prokázala borrelie v biopsiích z myokardu u pacientů s kardiomyopatií a myokarditidou, v práci slovenských autorů i v likvoru (Schwarzová K. et al., 2009; Derler AM. et al., 2009; Paleček T. et al. 2010). Časná diagnostika borreliózy umožňuje včasnou a cílenou léčbu pacienta, snižuje, až zabraňuje rozvoji dalších závažnějších forem onemocnění. EM v diagnostice neuroinfekcí není standardní metodou, je problematická interpretace výsledků a vyžaduje zkušeného laboratorního pracovníka a navíc může být zatížena subjektivní chybou. Na základě výsledků našeho pracoviště se domníváme, že by neměla být součástí rutinního vyšetřování, může být doplňkovou metodou u klinicky nejasných a závažných stavů (Petroušová L. et al. 2013).

V souboru aseptických meningitid PCR metody objasnily 144 původců, přitom izolovaný průkaz byl u 123 původců, což je 17 % ze všech objasněných neuroinfekcí a 10 % ze všech aseptických zánětů CNS. Rutinní používání PCR metod je opodstatněné. Vzhledem k variabilitě původců, kteří v našich podmínkách způsobují neurologické postižení, považujeme za výhodné kombinovat v diagnostice vždy více metod současně, v případě aseptických neuroinfekcí hlavně sérologické metody. Potenciálně preventabilní původci způsobili 257 onemocnění, což je 36 % ze všech objasněných a 21 % ze všech aseptických neuroinfekcí.

8. ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo prokázat význam molekulárně genetických metod v diagnostice neuroinfekcí

Naše studie přinesla tyto výsledky:

- kombinací všech dostupných metod byla objasněna etiologie u 73 % pacientů s purulentní meningitidou, a u 60 % pacientů s aseptickými neuroinfekcemi
- v souboru pacientů s purulentní meningitidou dominují pneumokokové meningitidy (25 %) u dospělých a meningokoková meningitida u dětí a adolescentů (18 %), třetím nejčastějším původcem je *Listeria monocytogenes* (5 %)
- v souboru pacientů s aseptickým meningitidami je nejčastěji prokázána borrelióza (26 %) a klíšťová encefalitida (16 %) a enteroviry (10 %)
- o závažnosti purulentní meningitidy svědčí, že 19 % pacientů zemřelo, u 15 % se rozvinuly komplikace, letalita aseptických neuroinfekcí byla malá – méně než 0,5 %, o závažnosti svědčí rozvoj komplikací u 28 % pacientů
- PCR vyšetření bylo provedeno u 186 pacientů (65 %) s purulentní meningitidou, pozitivní výsledek byl u 97 pacientů, což je 52 % ze všech vyšetřených pacientů
- jedinečná diagnostika jen metodou PCR byla u 18 % pacientů s purulentní meningitidou
- PCR metody byly pozitivní u 12 % pacientů ze všech pacientů s aseptickou neuroinfekcí, z toho vyšetření na průkaz enterovirů bylo použito u 368 pacientů s pozitivním nálezem u 104 pacientů, 28 % vyšetřených pacientů, na průkaz herpetických virů bylo vyšetřeno 367 pacientů, s pozitivním nálezem u 34 pacientů, 9 % vyšetřených
- jedinečná diagnostika jen metodou PCR byla u 10 % pacientů s aseptickými neuroinfekcemi
- potenciálně preventabilní původci způsobili onemocnění u 47 % pacientů s purulentní meningitidou
- potenciálně preventabilní původci způsobili onemocnění u 22 % pacientů s aseptickým zánětem CNS

9. SOUHRN

Neuroinfekce představují závažná onemocnění s možností rozvoje trvalých následků případně i úmrtím. Cílem práce bylo stanovit přínos molekulárně genetických metod v diagnostice neuroinfekcí a zastoupení potenciálně preventabilních původců u pacientů, kteří byli hospitalizováni v letech 2004 – 2013 na Klinice infekčního lékařství v Ostravě.

Prospektivní studie zahrnovala 1463 pacientů, z toho 283 pacientů s purulentní meningitidou a 1180 pacientů s aseptickou meningitidou. Kritériem pro stanovení diagnózy byl počet elementů v mozkomíšním moku převyšující 5 elementů/1 μ l. V diagnostice purulentních meningitid byla použita kultivace likvoru i hemokultury, PCR k detekci *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* typ b, *Neisseria meningitidis* a *Listeria monocytogenes*. V diagnostice aseptických meningitid byly použity sérologické metody k průkazu infekce virem klíšťové encefalitidy, enterovirů, epidemické parotitidy, *Mycoplasma pneumoniae* a lymeské borreliózy. PCR bylo využito k vyšetření enterovirů, epidemické parotitidy, HEV, chřipky a herpetických virů.

V souboru 283 pacientů s purulentní meningitidou byla etiologie objasněna u 73 % pacientů, PCR vyšetření bylo pozitivní u 35 % pacientů a u 18 % byla jedinou pozitivní metodou, která stanovila diagnózu. Potencionálně preventabilní původci byli prokázáni u 44 % pacientů.

V souboru 1180 pacientů s aseptickou meningitidou byla etiologie určena u 60 % pacientů, PCR vyšetření určilo etiologii u 12 % pacientů, u 10 % pacientů se jednalo o jedinou pozitivní metodu. Potencionálně preventabilní původci způsobili onemocnění u 22 % pacientů.

Výhodou PCR metod byla hlavně rychlost diagnostiky a možnost stanovit původce z materiálu po zahájení antibiotické terapie.

Vzhledem k uvedeným výsledkům považujeme používání PCR vyšetření v rutinní praxi za opodstatněné. Značná variabilita původců a dosud nemožnost metodou PCR stanovit citlivost na antibiotika vyžaduje i současné používání klasických kultivačních metod a v případě aseptických neuroinfekcí i doplnění sérologického vyšetření. Stanovení přesné diagnózy umožní cílenou terapii pacienta, deeskalaci antibiotické léčby, je prevencí antibiotické rezistence, zkracuje hospitalizaci a umožňuje dobrou surveillance onemocnění. Očkování představuje významnou možnost prevence neuroinfekcí a je žádoucí dále zvyšovat proočkovanosť hlavně rizikových skupin populace.

10. SUMMARY

Neuroinfections are serious diseases. They are associated with frequent development of permanent, debilitating consequences or even death. The aim of this work was to determine possible contribution of molecular genetic methods to diagnosis of neuroinfections and define potentially preventable agents in patients who were hospitalized at the Department of Infectious Diseases in Ostrava in the years 2004-2013.

The prospective study included 1,463 patients, of which 283 patients were hospitalized with purulent meningitis and 1,180 patients with aseptic meningitis. The criterion for the diagnosis was the number of elements in cerebrospinal fluid which had to exceed $5 \times 10^6/l$. The diagnosis of purulent meningitis was established by cultivation of cerebrospinal fluid and blood culture, polymerase chain reaction PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Listeria monocytogenes*. The diagnosis of aseptic meningitis was established by serological tests for tick-borne encephalitis, enterovirus, mumps, *Mycoplasma pneumoniae*, and Lyme disease. PCR was used to investigate enterovirus, influenza virus, and herpes viruses.

In case of the 283 patients with purulent meningitis the etiology was established in 73 % cases, PCR method was positive in 35 % cases and it was the only positive method in 18 % cases. The potentially preventable agents were detected in 44 % cases. In 1,180 patients the etiology was established in 60 % cases, PCR method was positive in 12 % cases, it was the only positive method in 10 % cases. The potentially preventable agents were detected in 22 % cases. The advantages of PCR methods were mainly the speed of diagnosis and the ability to determine the agents after starting antibiotic therapy.

Given these results, we consider the use of PCR testing suitable in routine practice. It is necessary to use simultaneously the conventional cultivation methods, and in the case of aseptic neuroinfection to use the serological test because of considerable variability of agents and also because of the fact that sensitivity to antibiotics still can not be determined by PCR. The determination of agents allows targeted therapy of a patient, de-escalation antibiotic therapy, it prevents antibiotic resistance, reduces hospitalization and allows good surveillance of a disease. Vaccination is an important prevention of neuroinfections and it is desirable to increase immunization coverage especially of high-risk groups of population.

11. SEZNAM ZKRATEK

CNS centrální nervový systém
CMV cytomegalovirus
CRP C reaktivní protein
ČR Česká republika
ČVS Česká vakcinologická společnost
DNA Deoxyribonukleová kyselina
EM elektronová mikroskopie
EBV Epstein Barrová virus
HEV virus hepatitidy E
Hib *Haemophilus influenzae* typ b
HIV virus lidské imunitní nedostatečnosti
HSV herpes simplex virus
IPO invazivní pneumokokové onemocnění
KE Klíšťová encefalitida
NK nukleová kyselina
PCR polymerázová řetězová reakce
RNA ribonukleová kyselina
RSV respirační syncycialní virus
VZV varicella zoster virus

12. LITERATURA

1. Aguilar J, Urday-Cornejo V, Donabedian S, Perri M, Tibbetts R, Zervos M. Staphylococcus aureus meningitis: case series and literature review. *Medicine*. 2010;89(2):117–25.
2. Akins PT, Belko J, Uyeki TM, Axelrod Y, Lee KK, Silverthorn J. H1N1 encephalitis with malignant edema and review of neurologic complications from influenza. *Neurocrit Care*. 2010;13(3):396–406.
3. Amaya-Villar R, García-Cabrera E, Sulleiro-Igual E, Fernández-Viladrich P, Fontanals-Aymerich D, Catalán-Alonso P, Rodrigo-Gonzalo de Liria C, Coloma-Conde A, Grill-Díaz F, Guerrero-Espejo A, Pachón J, Prats-Pastor G. Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *BMC Infect Dis*. 2010;10:324. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995464/>
4. Ambrose HE, Granerod J, Clewley JP, Davies NW, Keir G, Cunningham R, Zuckerman M. Diagnostic strategy used to establish etiologies of encephalitis in a prospective cohort of patients in England. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10): 3576–83.
5. Amicizia D, Domnich A, Panatto D, Lai PL, Cristina ML, Avio U, Gasparini R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum Vaccin Immunoth*. 2013;9(5):1163–71.
6. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, Aublet-Cuvelier B, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol*. 2009;81(1):42–8.
7. Basmaci R, Bonacorsi S, Bidet P, Biran V, Aujard Y, Bingen E, Béchet S, Cohen R, Levy C. *Escherichia Coli* meningitis features in 325 children from 2001 to 2013 in France. *Clin Infect Dis*. 2015;61(5):779-86.
8. Bednář M. Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice. *Remedia - Klinická Mikrobiologie*. 1997;1(4):115–22.
9. Beneš J. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén; 2009.
10. Ben Shimol S, Einhorn M, Greenberg D. *Listeria meningitis* and ventriculitis in an immunocompetent child: case report and literature review. *Infection*. 2012;40(2):207–11.
11. Bronská E, Džupová O, Křížová P, Kalmusová J, Marešová V. Invasive meningococcal disease and latex agglutination test--is it still beneficial for diagnosis? *Folia Microbiol*. 2005;50(5):453–6.
12. Bronská E, Kalmusová J, Džupová O, Marešová V, Kříž P, Beneš J. Dynamics of PCR-based diagnosis in patients with invasive meningococcal diseases. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(2):137-41.
13. Brouwer MC, van de Beek D, Heckenberg SG, Spanjaard L, de Gans J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clin Infect Dis*. 2006;43(10):1233–8.
14. Castelblanco RL, Lee M, Hasbun R. Epidemiology of bacterial meningitis in the USA from 1997 to 2010: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(9):813–9.
15. Částková J, Králová R. Aktuální materiály pro jednotné vykazování případu akutních chabých paréz. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*. 2009;18(6):200–3.

16. Čižman M, Jazbec J. Etiology of acute encephalitis in childhood in slovenia. *Pediatr Infect Dis J.* 1993;12(11):903–8.
17. Davis LE. Acute and recurrent viral meningitis. *Curr Treat Options Neurol.* 2008;10(3):168–77.
18. Davison KL, Crowcroft NS, Ramsay ME, Brown DW, Andrews NJ. Viral encephalitis in England, 1989-1998: What did we miss? *Emerg Infec Dis.* 2003;9(2):234–40.
19. Del Prete R, Di Taranto AM, Lipsi MR, Natalicchio MI, Antonetti R, Miragliotta G. Simultaneous detection of viruses and *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid specimens by multiplex polymerase chain reaction-based reverse hybridization assay. *New Microbiol.* 2009;32(2):143–6.
20. Derler AM, Eisendle K, Baltaci M, Obermoser G, Zelger B. High Prevalence of ‚Borrelia-like‘ organisms in skin biopsies of sarcoidosis patients from Western Austria. *J Cutan Pathol.* 2009;36(12):1262–8.
21. Deutschmann MW, Livingstone D, Cho JJ, Vanderkooi OG, Brookes JT. The Significance of *Streptococcus anginosus* group in intracranial complications of pediatric rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;139(2):157–60.
22. Dlouhý P, Honegr K, Krbková L, Pícha D, Roháčová H, Štruncová V. Lymeská borrelióza. Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2011;17(4):144–9.
23. Doporučení České vakcinologické společnosti pro očkování proti invazivním meningokokovým onemocněním. 2014. Dostupné z <http://www.vakcinace.eu/doporuceni-a-stanoviska>.
24. Duniewicz M, Adam P, a kolektiv. *Neuroinfekce.* 1. vyd. Praha: Maxdorf; 1999.
25. Džupova O, Rozsypal H, Procházka B, Benes J. Acute bacterial meningitis in adults: predictors of outcome. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(5):348–54.
26. Džupova O, Rozsypal H, Smiskova D, Benes J. *Listeria monocytogenes* meningitis in adults: the Czech Republic experience. *BioMed Res Int.* 2013;846186. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3784069/doi:10.1155/2013/846186>.
27. Džupová O, Polívková S, Smíšková D, Beneš J. Epidemiologické, klinické a laboratorní charakteristiky purulentních meningitid u dospělých pacientů. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2010;16(2):58–63.
28. Edwards MS, Baker CJ. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):839–47.
29. Favaro M, Savini V, Favalli C, Fontana C. A multi-target real-time PCR assay for rapid identification of meningitis-associated microorganisms. *Mol Biotechnol.* 2013;53(1):74–9.
30. Franzen-Rohl E, Larsson K, Skoog E, Tiveljung-Lindell A, Grillner L, Aurelius E, Glimåker M. High diagnostic yield by CSF-PCR for entero- and herpes simplex viruses and TBEV serology in adults with acute aseptic meningitis in Stockholm. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(11-12):914–21.
31. Fukushima K, Noda M, Saito Y, Ikeda T. *Streptococcus sanguis* meningitis: report of a case and review of the literature. *Intern Med.* 2012;51(21):3073–6.
32. Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam, a R, Nagel M. Varicella zoster virus vasculopathies: diverse clinical manifestations, laboratory features, pathogenesis, and treatment. *Lancet Neurol.* 2009;8(8):731–40.

33. Gilden D, Cohrs RJ, Mahalingam R, Nagel MA. Neurological disease produced by Varicella zoster virus reactivation without rash. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;342:243–53.
34. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, Cunningham R. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(12):835–44.
35. Granerod J, Cousens S, Davies NW, Crowcroft NS, Thomas SL. New estimates of incidence of encephalitis in England. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1455–62.
36. Harrison OB, Brueggemann AB, Caugant DA, van der Ende A, Frosch M, Gray S, Heuberger S et al. Molecular typing methods for outbreak detection and surveillance of invasive disease caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, a review. *Microbiology*. 2011;157(8):2181–95.
37. Heath PT. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: a review of efficacy data. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17(9Supp):S117–22.
38. Hilal T, Hurley P, McCormick M. Disseminated tuberculosis with tuberculous meningitis in an immunocompetent host. *Oxf Med Case Reports*. 2014;(7):125–8.
39. Hottenrott T, Rauer S, Bäuerle J. Primary Epstein-Barr virus infection with polyradiculitis: a case report. *BMC Neurol*. 2013;13:96. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2377/13/96>.
40. Hrabák J, Buncek M, Dendis M, Horváth R, Chronáková A, Libra A, Nesvera J et al. The use of molecular genetics techniques in clinical microbiology-final report from the workshop of the Molecular microbiology working group TIDE. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2010;59(3):103–6.
41. Chalupa P, Vašíčková P, Pavlik I, Holub M. Endemic hepatitis E in the Czech Republic. *Clin Infect Dis*. 2014;58(4):509–16.
42. Chiang F, Panyaping T, Tedesqui G, Sossa D, Leite CC, Castillo M. Varicella zoster CNS vascular complications. A report of four cases and literature review. *Neuroradiol J*. 2014;27(3):327–33.
43. Chlábek R. Česká vakcinologická společnost. Očkovací kalendář pro dospělé. Dostupné z: http://www.vakcinace.eu/data/files/ockov_kal_2015.pdf
44. Chlábek R, Smetana J, Boštíková V, Hanovcová I, Šplíňo M. Očkování proti pneumokokovým onemocněním v dospělosti. *Vakcinologie*. 2014;8(3):118–24.
45. Chmielewski T, Fielt J, Gniadkowski M, Tylewska-Wierzbanowska S. Improvement in the laboratory recognition of Lyme borreliosis with the combination of culture and PCR methods. *Mol Diagn* 2003;7(3-4):155–62.
46. Choi R, Kim GM, Jo IJ, Sim MS, Song KJ, Kim BJ, Na DL, et al. Incidence and clinical features of herpes simplex viruses (1 and 2) and varicella-zoster virus infections in an adult Korean population with aseptic meningitis or encephalitis. *J Med Virol*. 2014;86(6):957–62.
47. Jmor F, Emsley HC, Fischer M, Solomon T, Lewthwaite P. The Incidence of acute encephalitis syndrome in western industrialised and tropical countries. *Virol J*. 2008;5:134. Dostupné z <http://www.virologyj.com/content/5/1/134>.
48. Kamar N, Abravanel F, Lhomme S, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E Virus: Chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(1):20–7.

49. Kamar N, Bendall RP, Peron JM, Cintas P, Prudhomme L, Mansuy JM, Rostaing L, et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(2):173–9.
50. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):116–38.
51. Kazdová, K., a Z. Hubálek. Vyšetření komárů na přítomnost arbovirů na jižní Moravě v letech 2006–2008. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2010;59(3):107–11.
52. Khetsuriani N, Holman RC, Anderson LR. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988–1997. *Clin Infect Dis.* 2002;35 (2):175–82.
53. Koskiniemi M, Vaheri M. Effect of measles, mumps, rubella vaccination on pattern of encephalitis in children. *Lancet.* 1989;1(8628):31–4.
54. Kozáková J, Šebestová H, Křížová P. Invazivní pneumokokové onemocnění v České republice v roce 2013. *Zprávy CEM (SZÚ Praha).* 2014;23(3):89–97.
55. Křížová P, Musílek M, Vacková Z, Bečvářová Z, Kozáková J. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice v roce 2013. *Zprávy CEM (SZÚ Praha).* 2014;23(3):83–9.
56. Křížová P, Rožnovský L. Meningokokové onemocnění : klinický obraz, epidemiologie, diagnostika, léčba a prevence. Praha: Maxdorf;2011.
57. Křížová P, Vacková Z, Musílek M, Kozáková J. Invazivní meningokokové onemocnění v České republice – analýza epidemiologické situace a doporučení k vakcinační strategii. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2013;62(4):138–47.
58. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology.* 2006;66(1):75–80.
59. Kyaw MH, Rose CE, Fry AM, Singleton JA, Moore Z, Zell ER, et al. The influence of chronic illnesses on the incidence of invasive pneumococcal disease in adults. *J Infect Dis.* 2005;192(3):377–86.
60. Labská K, Roubalová K, Pícha D, Marešová V. Presence of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis and enteroviral meningoencephalitis. *J Med Virol.* 2015;87(7):1235–40.
61. Lebedová V, Beneš Č, Křížová P. Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v roce 2012. *Zprávy CEM (SZÚ Praha).* 2013;22(4): 37–41.
62. Lebedová V, Beneš Č, Křížová P. Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v období 2009–2013. *Zprávy CEM (SZÚ Praha).* 2014;23(5):170–74.
63. Lee BE, Davies HD. Aseptic meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(3):272–7.
64. Le Monnier A, Abachin E, Beretti J-L, Berche P, Kayal S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real-Time PCR for the *hly* Gene. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3917–23.
65. Limberková R, Lexová P. Výsledky genotypizace, laboratorní diagnostika a epidemiologie viru příušnic cirkulujícího v České republice v roce 2012. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014;63(1):36–42.
66. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;10(3):190–212.
67. Mailles A, Vaillant V, Stahl J-P. Infectious encephalitis in France from 2000 to 2002: the hospital database is a valuable but limited source of information for epidemiological studies. *Médecine Mal Infect.* 2007;37(2):95–102.

68. McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet*. 2012;380(9854):1703–11.
69. Měchurová, A., R. Vlk, a V. Unzeitig. Doporučený postup při screeningu a léčbě streptokoků skupiny B v těhotenství. *Ceska Gynekol*. 2004; 69(5):421–22.
70. Miller S, Mateen FJ, Aksamit AJ. Herpes simplex virus 2 meningitis: a retrospective cohort study. *J Neurovirol*. 2013;19(2):166–71.
71. Morishima T, Togashi T, Yokota S, Okuno Y, Miyazaki C, Tashiro M, et al. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. *Clin Infect Dis*. 2002;35(5):512–7.
72. Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I, et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2010;17(1):8–16.
73. CDC report. Acute Flaccid Myelitis in US Children. CDC. 2015. Dostupné z <http://www.cdc.gov/ncird/investigation/viral/2014-15/investigation.html>.
74. Newland JG, Romero JR, Varman M, Drake C, Holst A, Safranek T, et al. Encephalitis associated with influenza B virus infection in 2 children and a review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2003;36(7):87–95.
75. Noska A, Kyrillos R, Hansen G, Hirigoyen D, Williams DN. The role of antiviral therapy in immunocompromised patients with herpes simplex virus meningitis. *Clin Infect Dis*. 2015;60(2):237–42.
76. O'Callaghan M, Mok T, Lefter S, Harrington H. Clues to diagnosing culture negative *Listeria rhombencephalitis*. *BMJ Case Rep*. 2012; Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4543774/>
77. Oyanguren B, Esteban L, Guillán M, de Felipe A, Alonso Cánovas A, Navas E, et al. Central nervous system involvement in adult patients with invasive infection caused by *Streptococcus agalactiae*. *Neurol Barc Spain*. 2015;30(3):158–62.
78. Palecek T, Kuchynka P, Hulinska D, Schramlova J, Hrbackova H, Vitkova I, et al. Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2010;199(2):139–43.
79. Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Mirand A, Chambon M, Regagnon C, Laurichesse H, et al. From prospective molecular diagnosis of enterovirus meningitis to the prevention of antibiotic resistance. *Médecine Mal Infect*. 2006;36(3):124–31.
80. Pellegrino P, Carnovale C, Perrone V, Salvati D, Gentili M, Brusadelli T. Epidemiological analysis on two decades of hospitalisations for meningitis in the United States. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(9):1519–24.
81. Persson A, Bergström T, Lindh M, Namvar L, Studahl M. Varicella-zoster virus CNS disease--viral load, clinical manifestations and sequels. *J Clin Virol*. 2009;46(3):249–53.
82. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A. Akutní encefalitida vyvolaná virem chřipky B – kazuistika. *Čes Slov Neurol Neurochir*. 2013;76(4):515–7.
83. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A, Vašíčková P, Woznicová I. Neurologická komplikace hepatitidy E – kazuistika. *Čes Slov Neurol Neurochir*. 2015;78(2):220-2.
84. Petroušová L, Rožnovský L, Zelená H, Pomiklová M, Vidličková I, Mrázek J. Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lek*. 2013;19(3):85-90.

85. Philip N, William T, William DV. Diagnosis of tuberculous meningitis: challenges and promises. *Malays J Pathol.* 2015;37(1):1–9.
86. Pícha D, Moravcová L, Ždárský E, Marešová V, Hulínský V. PCR in lyme neuroborreliosis: a prospective study. *Acta Neurol Scand.* 2005;112(5):287–92.
87. Pintado V, Meseguer MA, Fortún J, Cobo J, Navas E, Quereda C, et al. Clinical study of 44 cases of *Staphylococcus aureus* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(12):864–8.
88. Rainetová P, Jiřincová H, Musílek M, Nováková L, Vodičková I, Štruncová V, et al. Sekvence enterovirů jako nový přístup k laboratorní diagnostice pro klinické i epidemiologické účely. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2015;64(2):102–6.
89. Rožnovský L, Gutvirth J, Beneš J, Dostál V, Kasal E, Hobstová J, et al. Invazivní meningokoková onemocnění - úvodní diagnostika, léčba a převoz pacientů. *Vox Pediatr.* 2013;13(1):nestr.
90. Santos-Antunes J, Magro F, Macedo G. *Listeria monocytogenes* bacteremia and CMV colitis in a patient with Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis.* 2014;8(3):254–5.
91. Science M, MacGregor D, Richardson SE, Mahant S, Tran D, Bitnun A. Central nervous system complications of varicella-zoster virus. *J Pediatr.* 2014;165(4):779–85.
92. Selva L, Ciruela P, Esteva C, de Sevilla MF, Codina G, Hernandez S, et al. Serotype 3 is a common serotype causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years old, as identified by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(7):1487–95.
93. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Kim JM, Shin SY, Koo SH. Evaluation of the Seeplex® Meningitis ACE Detection kit for the detection of 12 common bacterial and viral pathogens of acute meningitis. *Ann Lab Med.* 2012;32(1):44–9.
94. Schlech WF, Ward JI, Band JD, Hightower A, Fraser DW, Broome CV. Bacterial meningitis in the United States, 1978 through 1981. The National Bacterial Meningitis Surveillance Study. *JAMA.* 1985;253(12):1749–54.
95. Schwarzová K, Kost'ánová Z, Holečková K, Špitalská E, Boldis V. Direct detection of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in patients with early disseminated Lyme borreliosis. *Cent Eur J Public Health.* 2009;17(4):179–82.
96. Smišková D, Džupová O, Pícha D. Těžký průběh klíšťové meningoencefalitidy - je věk jediným faktorem, který nepříznivě ovlivňuje prognózu pacientů?. *Vakcinologie.* 2013;7(3):130–4
97. Stefanoff P, Rogalska J, Zajkowska J, Czarska M, Seroka W, Czarkowski MP. Surveillance of aseptic central nervous system infections in Poland: is it meeting its objectives? *Euro Surveill.* 2011;16(29). Dostupné z: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19924>
98. Stellrecht KA, Harding I, Woron AM, Lepow ML, Venezia RA. The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *J Clin Virol.* c 2002;25(Suppl 1):S19–26.
99. Svobodová M, Knízek P, Kracmarová R, Stepánová V, Förstl M. Klíšťová encefalitida ve východočeském regionu a úskalí její mikrobiologické diagnostiky. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2010;59(3):112–8.
100. Šebesta O, Rettich F, Minár J, Halouzka J, Hubálek Z, Juricová Z, et al. Presence of the mosquito *Anopheles hyrcanus* in South Moravia, Czech Republic. *Med Vet Entomol.* 2009;23(3):284–6.

101. Šimetka O, Petroš M, Podešvová H. Prevence časné formy onemocnění novorozenců streptokoky skupiny B: neonatální outcome po zavedení doporučeného postupu *Cesk Gynecol.* 2010;75(1):41–46.
102. Šplíňo M, Chlíbek R, Lidký enterovirus D-68-výskyt akutních chabých paréz-USA. *Vakcinologie.* 2015;9(2):92-93.
103. Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, et al. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *N Engl J Med.* 2011;364(21):2016–25.
104. Thompson C, Kneen R, Riordan A, Kelly D, Pollard AJ. Encephalitis in children. *Arch Dis Child.* 2012;97(2):150–61.
105. Thwaites G, Fisher M, Hemingway C, Scott G, Solomon T, Innes J, et al. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children. *J Infect.* 2009;59(3):167–87.
106. Trevejo RT. Acute encephalitis hospitalizations, California, 1990-1999: unrecognized arboviral encephalitis? *Emerg Infect Dis.* 2004;10(8):1442–9.
107. Trmal J, Pavlík I, Vašíčková P, Matějčková L, Šimůnková L, Lukš S, et al. Epidemie virové hepatitidy E v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2012;61(1-2):15–20.
108. Tveitnes D, Natås OB, Skadberg Ø, Øymar K. Lyme meningitis, the major cause of childhood meningitis in an endemic area: a population based study. *Arch Dis Child.* 2012;97(3):215–20.
109. Vacková Z, Klímová M, Kozáková J. Nová metoda a schéma typizace *Streptococcus pneumoniae*. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2013;62(2):50–4, 56–8.
110. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med.* 2004;351(18):1849–59.
111. Van Gastel E, Bruynseels P, Verstrepen W, Mertens A. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(9):651–3.
112. Vlčková J, Rupeš V, Horáková D, Kollárová H, Holý O. Rizika šíření viru západonilské horečky v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Imunologie.* 2015;64(2):80-6.
113. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology.* 2012;142(6):1388–97.
114. Who Publication. Vaccines against Tick-Borne Encephalitis: WHO Position Paper--Recommendations. *Vaccine* 2011;29(48):8769–70.
115. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49(1):13–21.
116. Yung CF, Andrews N, Bukasa A, Brown KE, Ramsay M. Mumps complications and effects of mumps vaccination, England and Wales, 2002-2006. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(4):661–7.
117. Zavadská D, Anca I, André F, Bakir M, Chlíbek R, Čížman M, et al. Recommendations for tick-borne encephalitis vaccination from the Central European Vaccination Awareness Group (CEVAG). *Hum Vaccines Immunother.* 2013;9(2):362–74.

13. PŘÍLOHY

13.1. SEZNAM PUBLIKACÍ, ABSTRAKT, PŘEDNÁŠEK

13.1.1. Publikace s IF k tématu dizertace

1. Petroušová L, Rožnovský L, Hrbáč T, Jančová J. Aktinomykóza mozku – kazuistiky. *Cesk Slov Neurol N.* 2009;72(3):270-273. Impact factor: 0,319
2. Papa A, Zelená H, Barnetová D, Petroušová L. Genetic detection of Dobrava/Belgrade virus in Czech patient with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1187-1190. Impact factor 4,784
3. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A. Akutní encefalitida vyvolaná virem chřipky B – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N.* 2013;76(4):515-17. Impact factor 0,159
4. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A, Vašíčková P, Woznicová I. Neurologické komplikace hepatitidy E – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N* 2015;78(2):220-222. Impact factor 0,165

13.1.2. Publikace bez IF k tématu dizertace

1. Petroušová L. Pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti jejich prevence. X. kongres praktických lékařů a sester. 26. – 27. 4. 2012 Olomouc. *Abstrakta Medicína pro praxi.* 2012;9(SupplA):20.
2. Petroušová L. Pneumokoková meningitida aneb na koho číhá pneumokok. *Vakcinologie* 2013;7:31.
3. Petroušová L, Rožnovský L. Pneumokokové infekce u dospělých a jejich prevence. *Med. Praxi* 2013;10(3):104-07.
4. Petroušová L, Rožnovský L, Marešová V. Pneumokokové meningitidy na Klinice infekčního lékařství FN Ostrava v období 2004-2012. *Vakcinologie* 2013;7(2):58-61.
5. Petroušová L. Invazivní pneumokokové onemocnění u dospělých. *Medical tribune.* 2013;9(15):B6.
6. Petroušová L, Rožnovský L, Zelená H, Pomiklová M, Vidličková I, Mrázek J. Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lek.* 2013;19(3):85-90.
7. Petroušová L, Rožnovský L. Primární meningokoková konjunktivitida s rozvojem invazivního onemocnění. *Klin Mikrobiol Inf Lek.* 2013;19(3):107-108.
8. Petroušová L. Invazivní pneumokokové infekce u dospělých. *Očkování a cestovní medicína.* 2013;4(2):12-13.
9. Petroušová L, Zeleník K. Hluchota jako následek pneumokokové meningitidy u neočkovaného dítěte. In: Kolektiv autorů. *Pneumokoková onemocnění u dětí.* 1. vyd. Praha: Galén; 2013. s. 35-42.
10. Petroušová L, Zjevíková A. Klíšťová encefalitida u dětí. *Vakcinologie* 2014;8(1):28.
11. Petroušová L, Zjevíková A. Klíšťová encefalitida v dětském věku, význam očkování. *Pediatr. Praxi* 2014;15(2):67-69.
12. Petroušová L, Rožnovský L. Neurologické komplikace hepatitidy E – kazuistika. *Gastroent Hepatol.* 2014;68(Suppl 1):1S10.

13. Petroušová L. Likvorový nález z pohledu klinika, kazuistiky. *Klin. Biochem. Metabol.* 2014;22(2):100.
14. Petroušová L. Invazivní pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti prevence. *Med. praxi* 2015;12(Suppl. A).
15. Petroušová L, Ostárková B. Austrianův syndrom - vzácná forma invazivního onemocnění, kazuistika. *Vakcinologie* 2015;9(1):24.
16. Petroušová L, Orságová I, Rožnovský L. Závažný průběh hepatitidy E, kazuistiky. *Gastroent Hepatol.* 2015;69(Suppl 1):25.
17. Petroušová L, Širůček P, Ostárková B. Austrianův syndrom – vzácná forma invazivního onemocnění. *Med. Praxi* 2015;12(3):143-145.
18. Petroušová L, Rožnovský L, Marešová V. Preventabilní neuroinfekce. *Vakcinologie* 2015;9(4):183-188.

13.1.3. Publikace s IF bez vztahu k dizertaci

1. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Zjevíková A, Konečná M, Kloudová A, Mrázek J, Zelená H. Hodnocení profylaktických opatření po expozici biologickému materiálu. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 2014;63(1):50-55. Impact factor 0,306

13.1.4. Publikace bez IF bez vztahu k dizertaci

1. Rožnovský L, Orságová I, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A, Kabieszová L, Kůrková J, Pospíšek M. Opakovaná léčba pegylovaným interferinem s ribavirinem u pacientů s chronickou hepatitidou C – vlastní zkušenosti. *Klin Mikrobiol Inf Lek.* 2010;16(2):73-75.
2. Rožnovský L, Orságová I, Petroušová L, Tvrdík J, Kabieszová L, Rydlo M, Lochman I, Kloudová A. Malá účinnost vakcinace proti virové hepatitidě B u pacientů s pokročilým jaterním onemocněním. *Klin Mikrobiol Inf Lek.* 2010;16(5):179-181.
3. Petroušová L, Rožnovský L, Daněk T, Kula R, Mrázek J. Problematika péče o pacienty s pandemickou chřipkou. *Interní Med.* 2011;13(10):398-400.
4. Rožnovský L, Tvrdík J, Kabieszová L, Petroušová L, Orságová I, Hozáková L, Lochman I, Kloudová A, Valkovský I, Letocha P, Schwarzová S, Hladík M, Zjevíková A. Očkování proti virové hepatitidě B u pacientů s chronickým selháním ledvin – dvacetileté zkušenosti. *Vnitř Lek.* 2011 Oct;57(10):808-14.
5. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A. Přínos vyšetření rezistence na antivirotika při léčbě chronické hepatitidy B. XXXIX. májové hepatologické dny Karlovy Vary, 10. – 13. 5. 2011, *Gastroent Hepatol.* 2011;65(Suppl1):35.
6. Rožnovský L, Orságová I, Tvrdík J, Kabieszová L, Petroušová L, Kloudová A, Lochman I, Mrázek J. Očkování proti VHB u pacientů s renální insuficiencí. VII. Hradecké vakcinologické dny. 4. – 6. 10. 2012. *Vakcinologie* 2013;7:31.
7. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L. Očkování po poranění proti VHB. VII. Hradecké vakcinologické dny. 4. – 6. 10. 2012. *Vakcinologie* 2013;7:30.
8. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A, Matlerová Š, Vašíčková P. hepatitida E – aktuální problém. *Gastroent Hepatol.* 2013;67(Suppl 1):1S6.

9. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A. Profylaxe po poranění. *Gastroent Hepatol.* 2013;67(Suppl 1):1S7.
10. Rožnovský L, Kabieszová L, Petroušová L, Orságová I, Kloudová A, Mrázek J. Vakcína Fendrix u pacientů se selháním ledvin. *Gastroent Hepatol.* 2014;68(Suppl 1):1S10.

13.1.5. Přednášky s abstraktem

1. Petroušová L, Širůček P. Salmonelová sepsa a meningitida u 6měsíčního týraného dítěte, Český kongres o infekčních chorobách Liberec, 19. – 21. 9. 2007. Sborník abstrakt s. 33.
2. Petroušová L, Rožnovský L. Etiologie a diagnostika purulentních meningitid na Klinice infekčního lékařství FN Ostrava 2004 – 2007. Slezské dny preventivní medicíny 8. ročník, Karviná, 6. – 8. 2. 2008. Sborník abstrakt s. 36.
3. Rožnovský L, Křížová P, Ticháček M, Petroušová L. Úvodní diagnostika a léčba meningokokových onemocnění – retrospektivní zhodnocení. Slezské dny preventivní medicíny 8. ročník, Karviná 6. – 8. 2. 2008. Sborník abstrakt s. 35.
4. Zjevíková A., Petroušová L. Cryptococcus neoformans – příčina atypicky probíhající meningitidy u imunosuprimovaných pacientů. 10. PG kurz sepsa a MODS Ostrava, 22 – 25. 1. 2008. CD-ROM sborník.
5. Zjevíková A, Petroušová L, Januška. Závažné průběhy onemocnění klíšťovou encefalitidou v Ostravě v letech 1999 – 2007, Zjevíková A., Petroušová L., Januška. Moravské epidemiologické dny. Malá Morávka, 22. – 23. 5. 2008. Sborník abstrakt.
6. Petroušová L, Kraft O. Heerfordův syndrom – diferenciální diagnostika parotitidy, kazuistika. Český kongres o infekčních chorobách Pardubice, 3. – 5. 9. 2009. Abstrakta č. 18.
7. Petroušová L, Zjevíková A. Meticilin rezistentní Staphylococcus aureus původce infekční endokarditidy, kazuistika. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Olomouc, 29. – 31. 10. 2009. Sborník s. 82.
8. Rožnovský L, Petroušová L. Přednemocniční léčba u pacientů s meningokokovým onemocněním. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Olomouc, 29. – 31. 10. 2009, Sborník s. 100.
9. Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A. Využití PCR diagnostiky neuroinfekcí v klinické praxi, kazuistiky. Kongres rutinní analýza nukleových kyselin Pardubice, 27. – 28. 1. 2010. Sborník sdělení s. 23.
10. Mrázek J, Fischerová L, Petroušová L. Urgentní diagnostika bakteriálních meningitid PCR – 5leté zkušenosti. Kongres rutinní analýza nukleových kyselin Pardubice, 27. – 28.1.2010. Sborník sdělení s. 21.
11. Daněk T, Chrástěcký T, Brát R, Jursa R, Rožnovský L, Petroušová L, Kostřicová E, Dvořáčková J. ECMO – H1N1. 12. PG kurz sepsa a MODS Ostrava, 25. – 28. 1. 2010. CD–ROM sborník.
12. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A. Využití molekulárních genetických metod v diagnostice purulentních meningitid na Klinice infekčního lékařství FN Ostrava v letech 2004 – 2010. XV. Slovensko – Český kongres o infekčních chorobách Martin, 1. – 3. 6. 2011. Sborník s. 32.
13. Rožnovský L, Orságová I, Petroušová L. Očkování proti virové hepatitidě B u rizikových skupin. XV. Slovensko – Český kongres o infekčních chorobách Martin, 1. – 3. 6. 2011. Sborník s. 35.

14. Petroušová L. Klinická problematika onemocnění způsobené virem Pandemic A(H1N1) Slezské dny preventivní medicíny, Karviná 1. – 2. 3. 2011. CD-ROM Sborník.
15. Petroušová L. Pneumokokové infekce a možnosti prevence. Kongres pediatriů a dětských sester XXIX. dny praktické a nemocniční pediatrie Olomouc, 27 – 28. 5. 2011. Abstrakta Pediatrie pro praxi. 2011;12(Supp.A):14.
16. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A. Přínos vyšetření rezistence na antivirotika při léčbě chronické hepatitidy B. XXXIX. májové hepatologické dny Karlovy Vary, 10. – 13. 5. 2011, Gastroenterologie a hepatologie. 2011;65(Supp1):35.
17. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A. Neurologické komplikace chřipky B, kazuistika. Kongres Klinické mikrobiologie a infekčních nemocí, Plzeň, 21. – 23. 9. 2011. Sborník abstrakt s. 60.
18. Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A, Zelená H. Hantavirózy, kazuistiky našich pacientů. Kongres rutinní analýza nukleových kyselin Pardubice, 1. – 2. 2. 2012. Sborník abstrakt s. 10.
19. Mrázek J, Zelená H, Cignová A, Kloudová A, Petroušová L. Úskalí laboratorní diagnostiky hantavirových infekcí. Kongres rutinní analýza nukleových kyselin Pardubice, 1. – 2. 2. 2012. Sborník abstrakt s. 9.
20. Petroušová L, Rožnovský L. Legionelová pneumonie, pohled klinika. Slezské dny preventivní medicíny, Karviná 7. – 9. 3. 2012. CD-ROM Sborník.
21. Petroušová L. Pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti jejich prevence. X. kongres praktických lékařů a sester. 26. – 27. 4. 2012 Olomouc. Abstrakta Medicína pro praxi.2012;9(SupplA):20.
22. Rožnovský L, Orságová I, Petroušová L, Kloudová A, Lochman I, Mrázek J. Očkování proti virové hepatitidě B u pacientů s chronickým onemocněním ledvin a jater. XL. Májové hepatologické dny Karlovy Vary 16. – 18. 5.2012. Gastroenterologie a hepatologie. 2012;66(Supp1):12.
23. Petroušová L. Pneumokokové meningitidy, soubor pacientů na Klinice infekčního lékařství 2004 – 2011, možnosti prevence. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech Ostrava. 6. – 8. 6. 2012. Sborník abstrakt s. 54.
24. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A, Zelená H. Molekulární metody v diagnostice aseptických neuroinfekcí na Klinice infekčního lékařství Ostrava v letech 2004 – 2011. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech Ostrava. 6. – 8. 6. 2012. Sborník abstrakt s. 79.
25. Mrázek J, Zelená H, Petroušová L, Cignová A. Genetická charakterizace hantavirů u pacientů s postižením ledvin. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech Ostrava. 6. – 8. 6. 2012. Sborník abstrakt s. 37.
26. Rožnovský L, Kabieszová L, Petroušová L, Kloudová A, Mrázek J. Vertikální přenos viru hepatitidy C a G. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech Ostrava. 6. – 8. 6. 2012. Sborník abstrakt s. 81.
27. Petroušová L. Pneumokoková meningitida aneb na koho číhá pneumokok. VII. Hradecké vakcinologické dny. 4. – 6. 10. 2012. Sborník abstrakt s. 49.
28. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L. Očkování po poranění proti VHB. VII. Hradecké vakcinologické dny. 4. – 6. 10. 2012. Sborník abstrakt s. 47.
29. Rožnovský L, Orságová I, Tvrdík J, Kabieszová L, Petroušová L, Kloudová A, Lochman I, Mrázek J. Očkování proti VHB u pacientů s renální insuficiencí. VII. Hradecké vakcinologické dny. 4. – 6. 10. 2012. Sborník abstrakt s. 54.

30. Petroušová L, Rožnovský L. Klíšťová encefalítida – stále aktuální, zkušenosti z posledních 6 let. Slezské dny preventivní medicíny 2013. Karviná 6. – 8. 3. 2013. Sborník abstrakt s. 16.
31. Zelená H., Mrázek J., Petroušová L. Hantavirové infekce aneb krvácivé horečky ve střední Evropě. XVII. slovensko-český kongres o infekčních chorobách. 13. – 15. 6. 2013. Poprad. CD-ROM Sborník.
32. Petroušová L, Rožnovský L, Zelená H, Pomiklová M, Vidličková I, Mrázek J. Využití elektronové mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí. XVII. slovensko-český kongres o infekčních chorobách. Poprad. 13. – 15. 6. 2013. CD-ROM Sborník.
33. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A, Matlerová Š, Vašíčková P. Hepatitida E – aktuální problém. XLI. Májové hepatologické dny. Karlovy Vary. 15. – 17. 5. 2013. Gastroent Hepatol. 2013;67(Suppl 1):1S6.
34. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, Mrázek J, Kloudová A. Profylaxe po poranění. XLI. Májové hepatologické dny. Karlovy Vary. 15. – 17. 5. 2013. Gastroent Hepatol. 2013;67(Suppl 1):1S7.
35. Petroušová L, Rožnovský L, Zelená H, Pomiklová M, Vidličková I. Neuroborrelióza diagnostika elektronovým mikroskopem. Český kongres o infekčních nemocech. Brno. 25. – 27.9 2013. Programový sborník.
36. Rožnovský L, Kabieszová L, Petroušová L, Orságová I, Kloudová A, Mrázek J. První zkušenosti s vakcínou Fendrix u pacientů se selháním ledvin. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí a epidemiologie. 4. ročník. 17. – 19.10 2013. Olomouc. Sborník přednášek s. 87.
37. Petroušová L, Zjevíková A. Klíšťová meningoencefalitida u dětí. IX. Hradecké vakcinologické dny. 3. – 5. 10. 2014. Hradec Králové. Sborník abstrakt s. 38.
38. Rožnovský L, Kabieszová L, Petroušová L, Orságová I, Kloudová A, Mrázek J. První zkušenosti s vakcínou Fendrix u pacientů se selháním ledvin. Kongres klinické mikrobiologie a infekčních nemocí a epidemiologie. 4. ročník. 17. – 19.10 2013. Olomouc. Sborník přednášek s. 87.
39. Petroušová L, Zjevíková A. Klíšťová meningoencefalitida u dětí. IX. Hradecké vakcinologické dny. 3. – 5. 10. 2014. Hradec Králové. Sborník abstrakt s. 38.
40. Petroušová L, Rožnovský L. Neurologické komplikace hepatitidy E – kazuistika. Gastroent Hepatol. 2014;68(Suppl 1):1S10.
41. Rožnovský L, Kabieszová L, Petroušová L, Orságová I, Kloudová A, Mrázek J. Vakcína Fendrix u pacientů se selháním ledvin. Gastroent Hepatol. 2014;68(Suppl 1):1S10.
42. Petroušová L. Likvorový nález z pohledu klinika, kazuistiky. Klin. Biochem. Metabol. 2014;22(2): 100.
43. Petroušová L, Rožnovský L, Orságová I. Trojkombinační léčba VHC boceprevirem – naše zkušenosti. XVIII. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech. Plzeň. 18. – 20. 6. 2014. Sborník abstraktů s. 41.
44. Petroušová L. Pneumokok stále aktuální – napříč generacemi. Kongres primární péče. Praha. 28. 2. – 1. 3. 2014. Abstrakta.
45. Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J. Zkušenosti s klinickými projevy hepatitidy E. Rank 2015. Pardubice. 4. – 5. 2. 2015. Sborník s. 17.
46. Petroušová L. Invazivní pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti prevence. II. kongres praktických lékařů a sester v Ostravě. Ostrava 5. – 6. 2. 2015. Abstrakta.
47. Petroušová L, Ostárková B. Austrianův syndrom - vzácná forma invazivního onemocnění, kazuistika. X. Hradecké vakcinologické dny. 2 – 4. 10. 2015. Hradec Králové. Sborník abstrakt s. 69.

48. Petroušová L, Rožnovský L. Závažný průběh hepatitidy E, kazuistika. 26. Pečenkovy epidemiologické dny. Luhačovice. 16. – 18. 9. 2015.
49. Petroušová L, Orságová I, Rožnovský L. Závažný průběh hepatitidy E, kazuistiky. Gastroent Hepatol. 2015;69(Suppl 1):25.
50. Petroušová L, Rožnovský L. Preventabilní neuroinfekce 10leté zkušenosti z Kliniky infekčního lékařství Ostrava. XIX. slovensko-český kongres o infekčních chorobách. Trnava, 10. – 12. 6. 2015. Sborník abstrakt.

13.1.6. Poster s abstraktem

1. Petroušová L, Trávníček B, Barnetová D, Haringová M. Těžký průběh klíšťové encefalitidy u 18letého chlapce – kazuistika. Český kongres o infekčních chorobách Moníec, 20. 9. – 23. 9. 2005. Sborník přednášek s. 70.
2. Petroušová L, Rožnovský L, Marešová V. Molekulární metody v diagnostice purulentních meningitid. Vědecká konference 2012 2. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy 28. – 29. 3. 2012. Sborník abstrakt s. 33.
3. Petroušová L, Rožnovský L, Marešová V. Molekulární metody v diagnostice purulentních meningitid na Klinice infekčního lékařství Ostrava 2004 – 2011. XVI. česko-slovenský kongres o infekčních nemocech Ostrava. 6. – 8. 6. 2012. Sborník abstrakt s. 88.
4. Petroušová L, Rožnovský L. Pneumococcal Meningitis in the North Moravia, Czech Republic – Experience from the Last Nine Years. The 2nd Conference on Controversies in Vaccination in Adult (CoVAC). Munich, Germany. February 14. – 17. 2013.
5. Petroušová L, Marešová V, Zelená H, Mrázek J. Elektronová mikroskopie a izolace viru v diagnostice aseptických neuroinfekcí. Vědecká konference 2015. 2. Lékařské fakulta University Karlovy 22. – 23. 4. 2015. Sborník abstrakt s. 67.

13.1.7. Přednášky bez abstrakt

1. Petroušová L. Epidemické parotitidy s komplikacemi. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, 9. 5. 2005.
2. Petroušová L., Trávníček B, Barnetová D, Haringová M. Těžký průběh klíšťové encefalitidy u 18letého chlapce – kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Zajímavé kazuistiky, 13. 12. 2005.
3. Petroušová L, Širůček P. Akutní meningoencefalitida etiologie Mycoplasma pneumoniae. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Mykoplazmatické infekce, 11. 9. 2007.
4. Petroušová L, Kraft O. Heerfordtův syndrom – diferenciální diagnostika parotitidy. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava, Zajímavé kazuistiky, 13. 5. 2008.
5. Petroušová L, Waloschek P. Systémová aktinomykóza. Seminář Kliniky infekčního lékařství, Ostrava, Klinicko – patologický seminář, 15. 1. 2008.
6. Petroušová L. Komplikace pneumokokové meningitidy. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Pneumokokové infekce, 8. 4. 2008.
7. Petroušová L. MRSA endokarditida se šťastným koncem. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Zajímavé kazuistiky, 9. 12. 2008.

8. Petroušová L. Diagnostika pneumokokových meningitid na Klinice infekčního lékařství FN Ostrava v letech 2004 – 2007. 17. ročník mezioborové semináře Třeboň, 12. – 14. 1. 2009.
9. Petroušová L. Pneumokoková sepe. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Klinicko-patologický seminář, 20. 1. 2009.
10. Petroušová L. Paracetamol – neškodné antipyretikum? Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Zajímavé kazuistiky, 12. 5. 2009.
11. Petroušová L, Waloschek P. Neobvyklý zdroj stafylokokové sepe. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Stafylokokové infekce, 8. 9. 2009.
12. Petroušová L. Streptococcus agalactiae, klinický obraz, kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Streptokokové infekce, 13. 10. 2009.
13. Petroušová L. Meningokoková infekce, neobvyklá patogeneze, kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Zajímavé kazuistiky, 8. 12. 2009.
14. Petroušová L. Chřipka H1N1 – kazuistiky našich pacientů. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava, Klinicko-patologický seminář, 12. 1. 2010.
15. Petroušová L. Diferenciální diagnostika parotitidy, kazuistiky. Seminář ORL Kliniky FN Ostrava, 1. 3. 2010.
16. Petroušová L. Invazivní pneumokokové infekce. Konference PLDD: Kojenecká problematika v ordinaci praktického lékaře Opava, 20. 3. 2010.
17. Petroušová L. Pneumokoky. Kongres Aktuální infekční nemoci v současnosti. Ostrava, 2. 11. 2010.
17. Petroušová L. Současné trendy léčby chronické hepatitidy C. Seminář Kliniky infekčního lékařství FN Ostrava pro praktické lékaře, Virové hepatitidy, 9. 11. 2010.
18. Petroušová L. Reaktivace chronické hepatitidy B, kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství, Klinicko-patologický seminář, 11. 1. 2011.
19. Petroušová L. Problematika chlamydiových infekcí. Odborná konference na téma problematika borreliových a chlamydiových infekcí. Ostrava. 15. 6. 2011.
20. Petroušová L. Neurologické komplikace chřipky B, kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava. Zajímavé kazuistiky. 3. 5. 2011.
21. Petroušová L. Enterovirové meningitidy, zajímavé kazuistiky. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Enterovirové infekce 11. 10. 2011.
22. Petroušová L. Pneumokok je pořád s námi. Seminář pro praktické lékaře pro děti a dorost. Opava 19. 11. 2011.
23. Petroušová L. Problematika chlamydiových infekcí. Seminář Kožního oddělení, FN Ostrava. 10. 11. 2011.
24. Petroušová L. Klinicky vážné a atypické průběhy chřipkové infekce. Problematika respiračních, střevních a exantematických virových nákaz. Jednodenní odborná konference. SZÚ Praha. 22. 11. 2011.
25. Petroušová L. Importované spalničky. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Zajímavé kazuistiky. 14. 12. 2011.
26. Petroušová L. Léčba virových hepatitid. Seminář pro praktické lékaře. Infekční nemoci. Ostrava 15. 12. 2011.
27. Petroušová L. Pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti jejich prevence. Seminář praktických lékařů. Zlín. 9. 1. 2012.
28. Petroušová L. Bulbární forma klíšťové encefalitidy. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Klinicko – patologický seminář. 10. 1. 2012.

29. Petroušová L. Pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti jejich prevence. Seminář praktických lékařů. Ostrava 19. 1. 2012.
30. Petroušová L. Pneumokoková onemocnění u dospělých a možnosti jejich prevence. Seminář praktických lékařů. Olomouc 21. 1. 2012.
31. Petroušová L. Pneumokok v éře vakcinace. Kongres pediatrů: Management primární péče. Ostrava 28. 1. 2012.
32. Petroušová L. Purulentní meningitida u pacienta s Diamond-Blackfanovou anémií. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Zajímavé kazuistiky. 10. 4. 2012.
33. Petroušová L. Pohled klinika na chřipku. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Chřipka. 9. 10. 2012.
34. Petroušová L. Legionelóza - kazuistiky. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Legionelózy. 20. 11. 2012.
35. Petroušová L. Klíšťová encefalitida – naše zkušenosti. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Klinicko – patologický seminář. 7. 1. 2013.
36. Petroušová L. Očkování u dospělých osob a doporučení pro pneumokokovou vakcinaci. Seminář pro praktické lékaře. Olomouc 19. 1. 2013.
37. Petroušová L. Očkování dospělých osob a doporučení pro pneumokokovou vakcinaci. Úskalí praktické medicíny I. Zlín. 20. 5. 2013.
38. Petroušová L. Pneumokokové infekce stále aktuální. Seminář kliniky infekčního lékařství. Nozokomiální nákazy. 18. 6. 2013.
39. Petroušová L. Klinická problematika chlamydiových infekcí. Odborná konference Chlamydie a mykoplazmata. Ostrava. 22. 5. 2013.
40. Petroušová L. Neuroborrelióza – diagnostika elektronovou mikroskopií. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Neuroinfekce. Ostrava. 8. 10. 2013.
41. Petroušová L. Neobvyklá etiologie oboustranné brachiální plexitidy. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Zajímavé kazuistiky. Ostrava 10. 12. 2013.
42. Petroušová L, Ostárková B. Neobvyklý projev pneumokokové infekce s fatálním koncem. Seminář Kliniky infekčního lékařství. Klinicko – patologický seminář. 14. 1. 2014.
43. Petroušová L. Vakcinace proti pneumokokům mýty a realita. Management ordinací PLDD 3. 25. 1. 2014 Ostrava.
44. Petroušová L. Klíšťová meningoencefalitida a borrelióza. Seminář praktických lékařů. Valašské Meziříčí. 17. 3. 2014.
51. Petroušová L. Hluchota jako následek pneumokokové meningitidy u neočkovaného dítěte. Aktuální případy z klinické praxe aneb s čím se může setkat každý z nás. Hradec Králové. 8. 4. 2014.
52. Petroušová L. Trojkombinační léčba boceprevirem u virové hepatitidy C – naše zkušenosti. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava. Zajímavé kazuistiky. 20. 5. 2014.
53. Petroušová L. Závažný průběh virové hepatitidy E – kazuistika. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava. Virové hepatitidy. 9. 9. 2014.
54. Petroušová L. Doporučené očkování pro dospělé. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava. Vakcinace. 11. 11. 2014.
55. Petroušová L. Klíšťová encefalitida a borrelióza. Seminář praktických lékařů Nový Jičín. 18. 3. 2015.
56. Petroušová L. Preventabilní neuroinfekce. Seminář praktických lékařů. Krnov 19. 5. 2015.
57. Petroušová L. Neobvyklý průběh průjmového onemocnění u mladé ženy. Seminář Kliniky infekčního lékařství Ostrava. Zajímavé kazuistiky. 11. 12. 2014.

13.1.8. Spoluautor knihy

1. Göpfertová D, Pazdiora P, a kol. 100 infekcí (epidemiologie pro praxi). Triton 2015. 285 stran.
2. Kolektiv autorů. Pneumokoková onemocnění u dětí, případy z klinické praxe. Galén 2013. 61 stran.

13.2. GRANT

Objasnění etiologie aseptických zánětů centrálního nervového systému, Grant MZ ČR-RVO-FNOs/2013, hlavní řešitel.

13.3. ČLÁNEK: ČESKÁ A SLOVENSKÁ NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE

Petroušová L, Rožnovský L, Hrbáč T, Jančová J. Aktinomykóza mozku – kazuistiky. *Cesk Slov Neurol N.* 2009;72(3):270-273.

13.4. ČLÁNEK: CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION

Papa A, Zelená H, Barnetová D, Petroušová L. Genetic detection of Dobrava/Belgrade virus in Czech patient with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1187-1190.

13.5. ČLÁNEK: ČESKÁ A SLOVENSKÁ NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE

Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A. Akutní encefalitida vyvolaná virem chřipky B – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N.* 2013;76(4):515-17.

13.6. ČLÁNEK: ČESKÁ A SLOVENSKÁ NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE

Petroušová L, Rožnovský L, Mrázek J, Kloudová A, Vašíčková P, Woznicová I.

Neurologické komplikace hepatitidy E – kazuistika. *Cesk Slov Neurol N* 2015;78(2):220-222.

13.7. ČLÁNEK: VAKCINOLOGIE

Petroušová L, Rožnovský L, Marešová V. Preventabilní neuroinfekce. *Vakcinologie* 2015;9(4)183-188.

13.8. POSTER: COVAC MUNICH

Petroušová L, Rožnovský L. Pneumococcal Meningitis in the North Moravia, Czech Republic – Experience from the Last Nine Years. The 2nd Conference on Controversies in Vaccination in Adult (CoVAC). Munich, Germany. February 14. – 17. 2013.