Vlivem fixace tkáně dochází k degradaci NK, proto je důležité zhodnotit kvalitu a množství získané NK. Pokud je kvalita nebo kvantita izolované NK nízká, je tento fakt nutné zmínit při hodnocení výsledku, neboť může být příčinou falešně negativního nálezu. Kvantita NK může být měřena jako absorbance při vlnové délce 260nm nebo fluorescenčně za použití barev vázající se do NK. Kvalitu je možné prověřit pomocí kontrolní PCR amplifikující lidské geny v různé známé délce. Pokud došlo k fragmentaci DNA následkem fixace a nelze detekovat úseky v lidské DNA o velikosti odpovídající nebo vyšší než délky amplikonů detekované v konkrétní reakci pro extrahumánnní genom, může být detekce falešně negativní (2).

**Polymerázová řetězová reakce, PCR**

PCR je rychlá, citlivá a specifická metoda, která umožňuje namnožení cílové sekvence DNA do té míry, že ji lze zviditelnit a/nebo dále s ní pracovat. Jedná se o reakci in vitro, tedy ve zkumavkách. Základem reakční směsi pro PCR jsou primery, volné nukleotidy, reakční pufr, hořečnaté ionty, enzym Taq DNA polymeráza a extrahovaná DNA. Reakce probíhá v přístrojích zvaných termocyklery, které cyklicky mění teplotu reakce pro jednotlivé kroky: denaturace, annealing a extenze. Denaturací se od sebe oddělí dvě vlákna DNA, aby na ně během annealingu mohly nasednout primery, což jsou krátké umělé úseky DNA (oligonukleotidy) komplementární ke hledané DNA sekvenci. Během extenze jsou k primerům enzymem Taq polymerázou přidávány volné nukleotidy z reakční směsi, a to přesně podle původního vlákna DNA. Takto se specificky syntetizuje pouze hledaný úsek DNA, neboť v reakci chybí primery pro jiné úseky DNA a DNA Taq polymeráza neumí syntetizovat nový řetězec bez těchto počátečních oligonukleotidů. Kroky denaturace, annealing a extenze projdou 30 i více cykly a díky tomu se namnoží původní vlákno DNA až na $10^{18}$ kopií. Takto namnožená DNA (amplikony) je již detekovatelná, a to nejčastěji po agarózové nebo kapilární elektroforéze a zviditelnění velikostně separovaných amplikonů nějakou interkalační barvou, jako je např. ethidium bromid nebo SYBR green.

**PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR)**

Pokud je genetická informace hledaného patogenu kódovaná v RNA (typicky některé viry) nebo, pokud se hledají změny v genomu nebo expresi na úrovní RNA, je nutné před vlastní PCR reakcí provést nejprve přepsání RNA do cDNA. To se provádí pomocí reverzní transkriptázy, což je enzym používaný retroviry.

**PCR v reálném čase, real-time PCR, kvantifikační PCR (qPCR)**

PCR v reálném čase používá téměř identické reagencie jako klasická PCR, ale nárůst množství amplikonů je sledován již během amplifikace, a to díky fluorescenčnímu značení vznikající DNA. Nespecificky značí nárůst fluorescenční barvy, např. SYBR Green, které se zabudovávají do dvouřetězcové DNA, a protože během reakce dochází k jejímu specifickému množení, vyzářená fluorescence exponenciálně narůstá (až do plató fáze dané vyčerpáním stavebních nukleotidů či polymerázy). Je možné také snímat nárůst specifické fluorescence díky využití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond specifických k hledané sekvenci. Rozlišuje se několik typů real-time sond, nejčastěji se využívají sondy typu molecular beacon, TaqMan a FRET (fluorescence resonance energy transfer). Nárůst fluorescence je měřen a vynášen do amplifikační křivky. Čím více je původní hledané DNA v reakci, tím méně cyklů je třeba k překročení takzvané prahové hodnoty (Ct), čehož se využívá pro kvantifikaci mikroorganismů, např. EBV viru v krvi. Výhodou real-time PCR je zejména vyšší rychlost a nižší riziko kontaminace, protože se již dále nepracuje s amplifikovaným PCR produktem.

**Multiplex PCR**

Jedná se o variantu real-time PCR. Při využití více druhů primerů a sond značených různými fluorescenčními barvami je možné v rámci jedné reakce detekovat a kvantifikovat více druhů mikroorganismů. Takto je možné v jedné reakci detekovat celé spektrum patogenů, které mohou mít klinicky podobné projevy, např. sexuálně přenosné bakterie způsobující cervicitidu a uretritidu jako *Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae* a mykoplazmy, nebo různé typy lidských papilomavirů (3).

**In situ hybridizace (ISH)**

ISH je založena na hybridizaci značené sondy k hledané sekvenci, a to se zachováním topografické informace. Podle typu značení sondy se rozlišují dva hlavní typy: CISH a FISH (chromogenní in-situ hybridizace a fluorescenční in-situ hybridizace). Při této technice tedy nevznikají uměle namnožené sekvence nukleových kyselin, což snižuje riziko kontaminace, které je např. u PCR značné, pokud se nedodržují zásady správné laboratorní techniky.

Postup ISH začíná fixací buněk či tkáně na mikroskopická skla. Sonda i cílová NK jsou většinou teplotně denaturovány při 95 °C, aby po snížení teploty na cca 37 °C mohla sonda specificky hybridizovat na cílové místo v NK. Po odstranění přebytku sondy se FISH preparáty odečítají ve fluorescenčním mikroskopu a CISH sondy se detekují enzymatickou reakcí generující zabarvení, jež je viditelné v běžném světelném mikroskopu. ISH se využívá zejména pro detekci virových patogenů (např. HPV, EBV či jiné herpetické viry), u kterých má informace o lokalizaci infekce v rámci tkáně diagnostický význam.

**Sekvenování DNA**

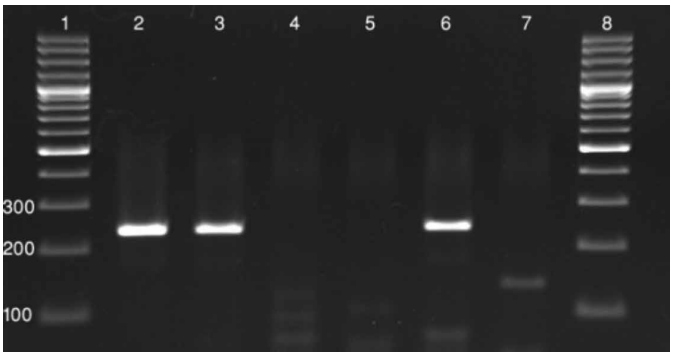
Nejrozšířenější metodou přesného stanovení pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA je Sangerovo sekvenování, také nazývané jako metoda dideoxynukleotidová. Tato metoda je paralelou k PCR, kdy k namnožené cílové DNA sekvenci je přidaný primer, DNA polymeráza, směs deoxynukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) a směs jejich dideoxynukleotidových variant (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP). Dideoxynukleotidům chybí hydroxylová skupina na 3´konci a jsou přidány v několikanásobně menším množství než deoxynukleotidy. Nejčastěji se používá varianta Sangerovy metody s fluorescenčním značení dideoxynukleotidů, kdy každý ze 4 dideoxynukleotidů je značen jinou fluorescenční barvou. Polymeráza syntetizuje cílovou molekulu do té doby, než náhodně zabuduje do vznikajícího řetězce dideoxynukleotid a tím se ukončí syntéza konkrétního vlákna, protože na dideoxynukleotid nelze navázat další nukleotid. Vzniká směs různě dlouhých řetězců, které jsou separovány kapilární elektroforézou. Fragmenty jsou separovány dle své velikosti a vyzařují fluorescenci podle zabudovaného dideoxynukleotidu, který je na poslední pozici řetězce. Takto vzniklé sekvence je možné porovnat se známými sekvencemi organismů v mezinárodních databázích veřejně dostupnými na internetu, např. BLAST, a určit infekční agens do rodu, druhu, typu i varianty (National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

**Sekvenování nové generace, NGS**

NGS systémy paralelně sekvenují obrovská množství poměrně krátkých vláken DNA, což přináší na jedné straně vysoký sekvenační výkon, ale na druhé straně je třeba výsledná data zpracovávat pomocí komplexních a výpočetně náročných bioinformatických metod, aby byla zrekonstruována původní sekvence vzorků. Nové modely sekvenátorů stále zvyšují svou kapacitu

a snižují jednotkovou cenu sekvenování. Existuje více NGS technologií, které mají své přednosti i nedostatky. Nejrozšířenější platformy v diagnostice jsou Solexa (Illumina), Ion Torrent (Life Technologies), a končící platforma 454 (Roche). Za zmínku stojí sekvenátory firmy Pacific Biosciences, která vyvíjí metodu sekvenování jedné molekuly v reálném čase a slibuje sekvenování velmi dlouhých řetězců (10 kilobází) a Oxford Nanopore, která se vymyká kapesní velikostí přístrojů.

Principem dvou nejrozšířenějších metod je sekvenace pomocí syntézy. DNA vzorku je rozdělena na krátké úseky (vytvoření knihovny), které jsou opatřeny signálními a adaptérovými sekvencemi. Následně dochází ke klonálnímu namnožení jednotlivých vláken sloužícímu k zesílení signálu a k syntéze komplementárního řetězcem, při které se detekují připojované nukleotidy. Poté jsou s využitím referenční sekvence (nebo de-novo) z fragmentů zpětně poskládány původní sekvence vstupní DNA a přiděleny k jednotlivým vzorkům podle signálních sekvencí. NGS systémy mají mnoho klinických využití, ve spojení s infekční patologií se dále budeme věnovat tématu analýzy mikrobiomu.

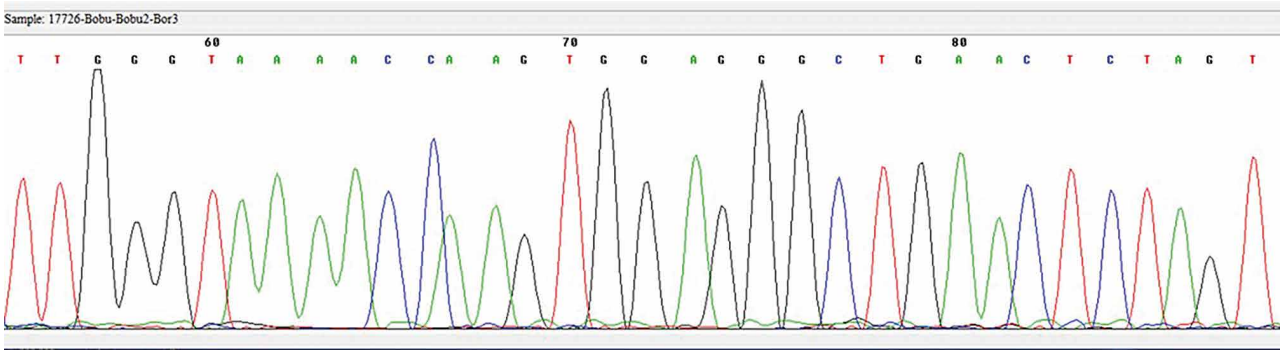



**Obr. 1**. Agarózový gel s produkty PCR po obarvení ethidium bromidem: v pozicích 1 a 8 je velikostní měřítko s produkty o velikosti 100, 200, 300 až 1500 párů bazí. V pozici 2 a 3 je amplifikovaný produkt PCR o velikosti mezi 200 - 300 párů bazí, která odpovídá délce hledaného produktu. Pozice 4 a 5 bez hledaného produktu, tedy negativní. V pozici 6 pozitivní kontrola (PCR s DNA hledaného patogena), v pozici 7 negativní kontrola (místo DNA voda).

## Molekulárně genetická detekce bakteriálních patogenů v patologii

Při použití molekulárně genetických metodik detekce bakteriálních agens v FFPE je třeba cílit na konkrétní agens na rozdíl od kultivačních metod, kdy lze detekovat poměrně široké spektrum mikroorganismů za stejných podmínek. Znamená to, že patolog volí pravděpodobná etiologická bakteriální agens, která mohou být zodpovědná za konkrétní lézi, a jejich přítomnost je testována z FFPE materiálu pomocí specifické PCR nebo systémem několika PCR, které určí biolog v molekulárně genetické laboratoři.

Jedním z nejčastějších požadavků na molekulárně mikrobiologické vyšetření je potvrzení či vyloučení přítomnosti *Borrelia burgdorferii* s.l. v lézi. Jedná se zejména o kožní léze erythrema migrans, boreliový lymfocytom a acrodermatitis chronica atrophicans. Zatímco diagnózu u prvního typu léze je možné stanovit klinicky, pro potvrzení diagnózy lymfocytomu a acrodermatitis chronica atrophicans je žádoucí průkaz borelií (4). Molekulárně genetický průkaz B*orrelia burgdorferii* je poměrně rychlou a citlivou/specifickou variantou ve srovnání se serologickým průkazem, který vyžaduje obvykle nejméně jednu další návštěvu pacienta v ordinaci lékaře. V naší laboratoři prokazujeme *Borrelia burgdorferii* s.l pomocí dvoukolové PCR s vyhodnocením na agarózovém gelu (obr. 1) a sekvenačním potvrzením. (obr. 2 a 3) a dostupností výsledku do několika dnů. Možnost průkazu boreliové DNA přímo z FFPE léze je zvláště přínosná, vzhledem k tomu, že zejména boreliový lymfocytom je poměrně často špatně diagnostikován jako lymfom (5).




**Obr. 2**. Výsledek sekvenační reakce - výsek sekvenogramu, barevně jsou odlišené jednotlivé báze v DNA.

**Borreliella burgdorferi strain Fr93 chromosome, complete genome**

Sequence ID: CP132421.1 Length: 909591 Number of Matches: 2

Range 1: 436692 to 436840 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---|---|---|---|---|
| 270 bits(146) | 3e-68 | 148/149(99%) | 0/149(0%) | Plus/Minus |

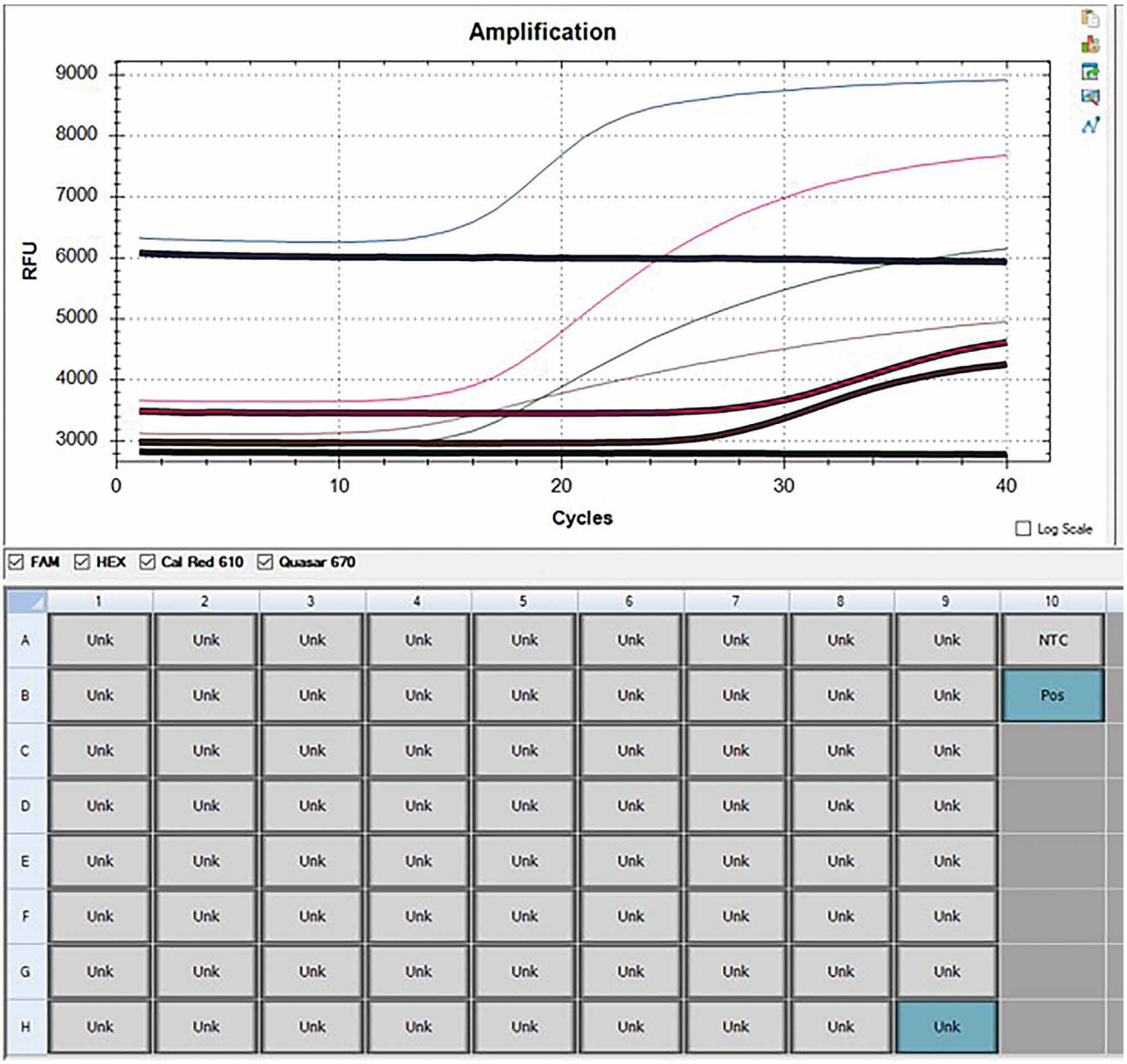
```
Query  1       GGCTGAAGCTTGGGTAAAACCAAGTGGAGGGCTGAACTCTAGTCTGTTTAAAAAGGCAGG  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436840  GGCTGAAGCTTGGGTAAAACCAAGTGGAGGGCCGAACTCTAGTCTGTTTAAAAAGGCAGG  436781

Query  61      GATGAGCTGTGAATAGGAGTGAAAGGCTAAACAAACTCGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGA  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436780  GATGAGCTGTGAATAGGAGTGAAAGGCTAAACAAACTCGGAGATAGCTGGTTCTCCCCGA  436721

Query  121     AATGGATTTAAGTTCAGCCTTATTTTAGT  149
               |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  436720  AATGGATTTAAGTTCAGCCTTATTTTAGT  436692
```

**Obr. 3.** Výsledek porovnání získané sekvence s mezinárodní databází BLAST.

Molekulárně genetický průkaz *Mycobacterium tuberculosis complex* je velice užitečný nástroj pro diagnostiku tuberkulózní infekce. Zejména PCR z klinických vzorků jako je sputum, aspiráty tekutin a tkáňové homogenizáty, umožňuje rychlou diagnostiku tuberkulózy s citlivostí nejméně srovnatelnou s kultivačním vyšetřením, ale za kratší dobu (3 dny pro PCR oproti 2 až 6 týdnům nutným pro kultivaci a identifikaci) (6). Citlivost detekce z FFPE materiálu je vysoká i v případě, kdy nejsou patrné Ziehl-Neelsen barvením pozitivní tyčinky v histologickém preparátu. Pomocí PCR lze také odlišit a detekovat non-tuberkulózní mykobakteria, jako je *M. avium/intracellulare (MAC), M. xenopi, M. marinum, M. ulcerans* a další. Pro FFPE materiál je výhodné využívat dvou-kolové PCR, které mají vyšší citlivost, neboť v lézi se většinou nacházejí pouze jednotky bakterií (7).

Přestože celosvětově jsou mykobakterie nejčastějším infekčním agens prokázaným v nekrotizujících granulomech, etiologie granulomatózního zánětu je široká, včetně infekčních, autoimunitních, toxických, alergických a neoplastických jednotek (8). Spektrum infekčních agens, která mohou vyvolat granulomatózní zánět, se mírně liší podle orgánové lokalizace léze. Z bakteriálních agens, které lze poměrně snadno detekovat v FFPE lézi, sem patří *Bartonella henselae, Francisella tularensis, Brucella spp, Actinomyces spp., Nocardia spp., Chlamydia trachomatis (L1, L2, L3 serovary)* či *Listeria monocytogenes (9)*. V naší laboratoři je možné všechny zmíněné patogeny detekovat pomocí jednoduché PCR, která je specifická pro každý z možných patogenů.

Z metodického hlediska, pokud existuje několik infekčních agens, které mohou indukovat podobný typ léze nebo klinického projevu, je vhodné pro jejich detekci použít multiplex PCR. Pro detekci možných infekčních agens v případě granulomatózní léze taková komerčně dodávaná multiplex PCR doposud neexistuje Existuje ale například multiplex PCR cílící více agens, které se mohou projevovat ulceracemi v anogenitální oblasti, a to jak bakteriální jako *Treponema pallidum* a *Chlamydia trachomatis (L1, L2, L3 serovary),* tak i virové ze skupiny Herpesviridae (obr. 4). Použití multiplex PCR pak snižuje riziko falešné negativity a umožňuje prokázat koinfekci (10).




**Obr. 4.** Multiplex real-time PCR – zobrazení na systému CFX96: barevné amplifikační křivky představují výsledky PCR cílící různé infekční agens. Vznikající produkty jsou odlišené sondami s rozdílnými fluorofory. Zvýrazněné křivky odpovídají vzorku se směsnou infekcí 2 patogenů. V pozadí pozitivní kontrola (nezvýrazněné křivky).

**Molekulárně genetická detekce virových patogenů v patologii**

Většina virových infekcí není asociována s charakteristickým zánětlivým procesem, přestože distribuce změn v tkáni nebo orgánu může poukazovat na virovou etiologii. Některé běžné virové infekce mohou být dobře identifikovatelné pomocí histologie, nicméně v mnoha případech cytopatický efekt viru není diagnostický, protože např. není specifický pro konkrétní viry a může být následkem infekce mnoha typů virů (11). K přesné identifikaci viru pak mohou pomoci specifické imunohistochemické či imunofluorescenční metody nebo molekulárně genetické techniky.

V postcovidové době je molekulárně genetický průkaz virových agens standardem i v klasické mikrobiologické laboratoři. Molekulárně genetická detekce virových agens z FFPE je velice podobná detekci bakteriálních agens. Tedy nejčastěji se využívá PCR a jejích modifikací, popřípadě RT-PCR, hledá-li se RNA virus (např. SARS-CoV-2 nebo enteroviry). V některých případech je opodstatněné ponechat topografickou informaci spojenou s pozitivitou pro hledané virové agens a zde je na místě použít k detekci techniku in-situ hybridizace.

Identifikace herpesvirů v FFPE tkáni je dobrým příkladem použití různých molekulárně genetických technik k jejich průkazu. Při detekci je možné cílit jednoduchou PCR jednotlivé typy virů jako v případě detekce lidského herpes viru 8 (HHV8) u HHV8 asociovaných onemocnění Kaposhiho sarkom, multicentrická Castelmanova choroba či primární efuzní lymfom. Nebo lze využít multiplex PCR, která v jediné reakci detekuje a rozliší téměř kompletní spektrum herpesvirů projevujících se podobnými klinickými příznaky, zejména HSV1, HSV2 a VZV. V případě detekce viru Epstein-Barrové (EBV) v FFPE materiálu se dává přednost metodice chromogenní in-situ hybridizace (12). Sonda detekuje nekódující malé RNA viru EBV (EBER) spojené s latentním stadiem infekce se zachováním topografické informace a patolog tedy přesně vidí, které buňky nebo úseky v tkáni jsou pozitivní. Vzhledem k možné falešné negativitě způsobené degradací RNA ve vzorku se doporučuje souběžně na dalším skle provádět kontrolní in-situ hybridizaci detekující lidskou RNA.

Molekulárně genetická detekce DNA dalších onkovirů obecně má svá specifika. Vzhledem k poměrně časté integraci DNA onkovirů do lidského genomu během progrese léze je lépe při detekci cílit do více míst virového genomu (13). Virus může během linearizace a integrace do lidského genomu některé geny deletovat nebo přerušit a PCR zaměřená do těchto míst by pak byla falešně negativní. Toto je třeba mít paměti zejména při detekci vysoce rizikových lidských papilomavirů (HR-HPV) nebo Merkel cell polyomaviru (14). Další možností je pak detekovat RNA virových onkogenů, která zůstává přítomna ve všech fázích karcinogeneze (15).

**Molekulárně genetická detekce houbových patogenů v patologii**

Průkaz fungálních infekcí pomocí molekulárně genetických technik z fixované tkáně musí podléhat přísnému zhodnocení patologem. Materiál je totiž skoro vždy kontaminován všudypřítomnými sporami hub. Podle nových pokynů mezinárodních organizací EORTC (Evropská organizace pro výzkum a léčbu rakoviny) a MSGERC (Studijní skupina pro mykózy) lze pro určení fungální infekce použít PCR z fixované a čerstvé tkáně, ale pouze v případě, že jsou houbové elementy identifikovány histologicky (16). PCR detekce houbových patogenů může být cílená na konkrétní rody se sekvenačním nebo hybridizačním dourčením druhu (např. detekce rodů *Aspergillus, Fusarium, Rhizopus nebo Candida)*. Také lze použít tzv. panfungální PCR cílící obecnou fungální DNA (např. oblast Internal Transcribed Spacer – ITS) a pomocí sekvenace úseku namnoženého PCR a porovnání s mezinárodní databází, př. BLAST, určit houbový organismus do rodu nebo i druhu. Pomocí panfungální PCR lze identifikovat jakékoli houbové agens bez předchozí znalosti jeho předpokládané identity, což může výrazně snížit čas a náklady vynaložené na jinou diagnostiku (17). Tento přístup lze použít např. také u hlubokých mykóz a invazivních houbových onemocnění.

**Molekulárně genetická detekce prvoků a parazitických červů v patologii**

Parazitické infekce ve střední Evropě nejsou takovým problémem jako v tropických a subtropických oblastech, nicméně i zde se setkáváme v histologii s některými lézemi způsobenými parazity. Histologickým znakem parazitárních onemocnění je většinou granulomatózní zánět. Mezi původce vyvolávající granulomy patří parazitičtí červi a parazité, kteří se replikují intracelulárně (18). Pro detekci DNA parazitů vyskytujících se v našich končinách nebo v častých turistických oblastech našich občanů se často využívají PCR cílící genové úseky s více kopiemi, jako jsou ribozomální a mitochondriální geny.

Z protozoálních infekcí provádíme PCR detekci r. *Leishmania* nejčastěji v suspektních kožních lézích u pacientů s cestovatelskou anamnézou. Pomocí PCR lze určit i druh leishmanie, což je důležitý faktor ovlivňující průběh onemocnění (19). V histologických vzorcích dále lze pomocí PCR prokázat Toxoplasma gondii v rámci primární nebo diseminované toxoplazmózy (20).

Z parazitických červů jsou v histologickém materiálu často detekováni původci cystické a alveolární echinokokózy, *Echinococcus granulosus* a *Echinococcus multilocularis*. Důležité je pomocí PCR detekovat všechny genotypy *E. granulosus*, neboť se sekvenčně dost liší (21).

**Analýza mikrobiomu: aplikace v laboratorní diagnostice**

Na lidském těle a v něm se nachází přibližně desetkrát více mikroorganismů než našich vlastních buněk. Soubor těchto mikroorganismů (bakterie, viry, houby a archaea) se nazývá mikrobiom. S trochou nadsázky můžeme říci, že každý z nás je více bakterií než člověkem a není tedy velkým překvapením, že mikrobiom hraje klíčovou roli v udržování lidského zdraví. Změny v mikrobiální komunitě mohou indikovat přítomnost zánětlivých onemocnění střev, jako je Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida. Dále se ukazuje, že mikrobiom může hrát roli v onemocněních jako jsou obezita, diabetes typu 2, neurodegenerativní poruchy jako jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba, ale i některé druhy rakovin. Z těchto důvodů přestavuje analýza mikrobiomu jednu z nejrychleji se rozvíjejících oblastí biomedicínského výzkumu a klinické diagnostiky.

Osekvenovat mikrobiom je technicky poměrně jednoduché. Proces začíná izolací DNA ze vzorku, který obsahuje mikrobiální buňky. Následně se pomocí PCR amplifikují variabilní úseky vybraných mikrobiálních genů. U bakterií se nejčastěji využívá sekvenování genu kódujícího 16S rRNA u hub se sekvenuje nekódující sekvence ITS1, která se nachází mezi geny pro 18S rRNA a 5.8S rRNA. Amplifikované fragmenty se sekvenují pomocí moderních sekvenačních technologií, jako je například technologie Illumina, které umožňují rychlé a přesné čtení mnoha krátkých úseků DNA najednou. Výsledné sekvence se poté bioinformaticky analyzují, jednotlivé mikroorganismy se identifikují do rodů a druhů a je rovněž možné zjistit jejich množství a vzájemný poměr.

Tento přístup poskytuje detailní pohled na složení a dynamiku mikrobiálních komunit a nabízí obrovský potenciál pro diagnostiku a léčbu různých onemocnění. V současnosti ale existuje několik klíčových překážek, které doposud brání jejímu plnému využití. Hlavním problémem je složitost samotného

mikrobiomu. Lidský mikrobiom je extrémně různorodý a dynamický (obr. 5). Lze říci, že se na Zemi vyskytuje osm miliard unikátních mikrobiomů, které se každý den mění v závislosti na stravě, životním stylu, geografii a mnoha dalších faktorech. Tato variabilita ztěžuje identifikaci univerzálních biomarkerů pro konkrétní onemocnění. Interpretace výsledků může být dále obtížná kvůli nedostatečnému pochopení funkcí mnoha mikroorganismů a jejich vzájemných interakcí v lidském těle. Početnost jednoho druhu mikroorganismu v mikrobiomu ovlivňuje početnost ostatních mikroorganismů. Z toho vyplývá, že není možné, aby se s těmito prvky zacházelo jako s nezávislými proměnnými. Každý detekovaný mikroorganismus je přítomen v rámci tohoto vzájemně závislého ekosystému, což činí interpretaci a analýzu výsledků nesmírně náročnou.

Rozvoj nových technologií a přibývající poznatky o lidském mikrobiomu rovněž vyžadují změny v chápání vztahů mezi mikroorganismy a nemocemi. Doposud je téměř výhradně aplikován tradiční přístup, který v počátcích moderní mikrobiologie zavedl německý lékař Robert Koch. Jeho postuláty zjednodušeně řečeno říkají, že vyvolavatelem sledovaného onemocnění je určitý mikroorganismus. Cílem diagnostických metod je potom odhalit tohoto konkrétního původce onemocnění. Dnes, kdy máme podrobnější znalosti o bakteriálních společenstvech hostitele, víme, že tyto postuláty nepředstavují jediný možný vztah mezi mikroorganismy a onemocněním hostitele. Existuje celá řada mikroorganismů, které nejsou patogeny v pravém slova smyslu, ale přesto mohou vyvolat onemocnění. Jedná se například o takzvané patobionty, mikroorganismy, které jsou přirozenou součástí lidského mikrobiomu a v běžných, fyziologických podmínkách se jedná o neškodné organismy, které jsou drženy na uzdě díky regulaci imunitním systémem a díky kompetici s ostatními mikroorganismy. Pokud je homeostáza organismu narušena, mohou se jinak neškodní patobionti stát patogenními a vyvolat onemocnění.

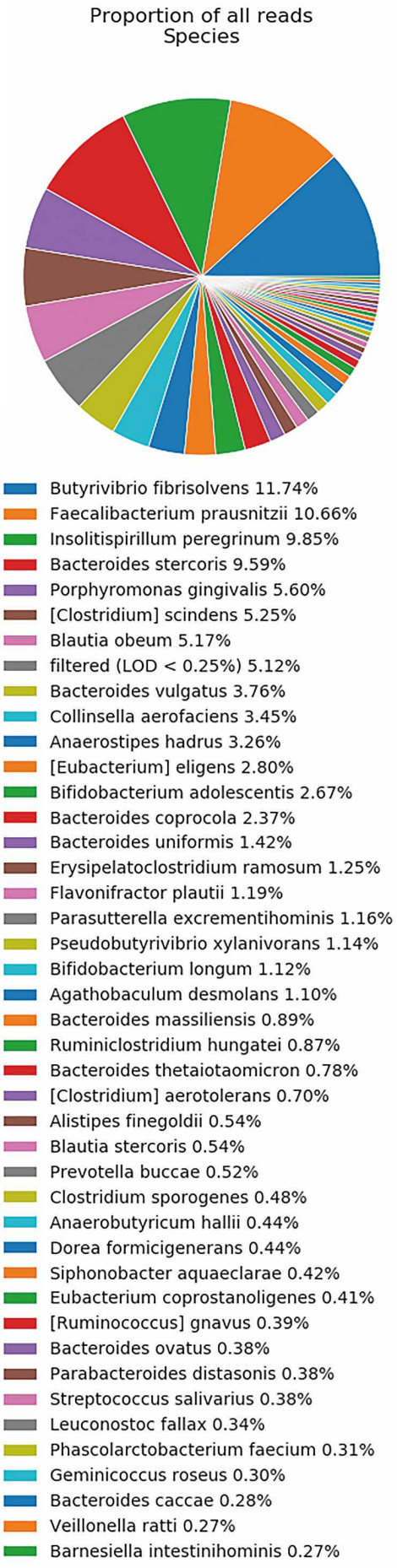
Navzdory značným pokrokům v analýze mikrobiomu tedy stále existují výzvy, které je třeba překonat. V současné podobě analýza mikrobiomu nenahradí tradiční metody cílící na identifikaci konkrétních patogenů. V porovnání s těmito metodami jsou limitujícími faktory zejména nízká záchytnost, horší využitelnost u formalínem fixovaných tkání a složitá interpretace výsledků. Díky přibývajícím mikrobiomovým datům, strojovému učení a možnostem umělé inteligence lze očekávat, že se v této oblasti diagnostiky odehraje v blízké době revoluce srovnatelná se zavedením NGS sekvenování širokého spektra genů v rámci diagnostického, prediktivního a prognostického testování nádorů.

## ZÁVĚR

Molekulárně biologické testy se stále častěji uplatňují v rutinní diagnostice. Mohou být použity i v případě, kdy klasické mikrobiologické metody nelze využít, jako je tomu u fixovaných tkání. V diagnostice celé řady patogenů mohou poskytovat často přesnější výsledky než metody tradiční, je ale třeba je vždy hodnotit v kontextu histologického nálezu. Jejich další výhodou je rychlost, citlivost a specificita průkazu infekčního agens. V tomto článku jsou zmíněny základní principy molekulárně mikrobiologických metod a jejich využití v rutinní patologické praxi.


### PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.


**Obr. 5.** Druhové složení střevního mikrobiomu dospělého člověka.

## LITERATURA


1. **Oba U, Kohashi K, Sangatsuda Y, et al.** An efficient procedure for the recovery of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Biol Methods Protoc* 2022; 7(1): bpac014.
2. **Van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al.** Design and standardization of pcr primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and t-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the biomed-2 concerted action bmh4-ct98-3936. *Leukemia* 2003; 17(12): 2257-2317.
3. **Lewinski MA, Alby K, Babady NE, et al.** Exploring the utility of multiplex infectious disease panel testing for diagnosis of infection in different body sites: A joint report of the association for molecular pathology, american society for microbiology, infectious diseases society of america, and pan american society for clinical virology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2023; 25(12): 857-875.
4. **Mullegger RR, Glatz M.** Skin manifestations of lyme borreliosis: Diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2008; 9(6): 355-368.
5. **Boudova L, Kazakov DV, Sima R, et al.** Cutaneous lymphoid hyperplasia and other lymphoid infiltrates of the breast nipple: A retrospective clinicopathologic study of fifty-six patients. *The American Journal of dermatopathology* 2005; 27(5): 375-386.
6. **Marchetti G, Gori A, Catozzi L, et al.** Evaluation of pcr in detection of mycobacterium tuberculosis from formalin-fixed, paraffin--embedded tissues: Comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol* 1998; 36(6): 1512-1517.
7. **Khosravi AD, Alami A, Meghdadi H, Hosseini AA.** Identification of mycobacterium tuberculosis in clinical specimens of patients suspected of having extrapulmonary tuberculosis by application of nested pcr on five different genes. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7(3.
8. **Shah KK, Pritt BS, Alexander MP.** Histopathologic review of granulomatous inflammation. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 2017; 7(1-12.
9. **Asano S.** Granulomatous lymphadenitis. *J Clin Exp Hematop* 2012; 52(1): 1-16.
10. **Rob F, Kaspirkova J, Juzlova K, Pesta M, Hercogova J.** Lymphogranuloma venereum with only proximal rectal involvement mimicking inflammatory bowel disease: A potential diagnostic pitfall. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31(5): e264-e265.
11. **Procop GW, Wilson M.** Infectious disease pathology. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001; 32(11): 1589-1601.
12. **Barletta JM, Kingma DW, Ling Y, et al.** Rapid in situ hybridization for the diagnosis of latent epstein-barr virus infection. *Mol Cell Probes* 1993; 7(2): 105-109.
13. **Svajdler M, Jr., Mezencev R, Kaspirkova J, et al.** Human papillomavirus infection and p16 expression in the immunocompetent patients with extragenital/extraungual bowen's disease. *Diagnostic pathology* 2016; 11(1): 53.
14. **Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, et al.** Improved detection suggests all merkel cell carcinomas harbor merkel polyomavirus. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122(12): 4645-4653.
15. **Krsek A, Baticic L, Sotosek V, Braut T.** The role of biomarkers in hpv-positive head and neck squamous cell carcinoma: Towards precision medicine. *Diagnostics (Basel)* 2024; 14(13):
16. **Lockhart SR, Bialek R, Kibbler CC, et al.** Molecular techniques for genus and species determination of fungi from fresh and paraffin-embedded formalin-fixed tissue in the revised eortc/msgerc definitions of invasive fungal infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2021; 72(Suppl 2): S109-S113.
17. **Buitrago MJ, Aguado JM, Ballen A, et al.** Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(6): E271-277.
18. **Papparella S.** [histology in diagnosis of parasitic diseases]. *Parassitologia* 2004; 46(1-2): 157-158.
19. **Momcilovic S, Cantacessi C, Arsic-Arsenijevic V, Otranto D, Tasic-Otasevic S.** Rapid diagnosis of parasitic diseases: Current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25(3): 290-309.
20. **Liu Q, Wang ZD, Huang SY, Zhu XQ.** Diagnosis of toxoplasmosis and typing of toxoplasma gondii. *Parasit Vectors* 2015; 8(292.
21. **Mcmanus DP.** Current status of the genetics and molecular taxonomy of echinococcus species. *Parasitology* 2013; 140(13): 1617-1623.


# MONITOR
## aneb **nemělo by vám uniknout, že ...**

**PATOLOGIE CNS**

### ... molekulárne glioblastómy s LG histomorfológiou a s izolovanou mutáciou promótora TERT majú signifikantne lepšiu prognózu ako „klasické glioblastómy"

Podľa 5. edície WHO klasifikácie nádorov CNS je potrebné difúzne gliómy u dospelých pacientov 2. a 3. stupňa malignity, ktoré sú negatívne na IDH mutáciu, ďalej testovať na tri molekulárne markery: EGFR amplifikáciu, mutáciu promótora TERT a zisky a straty na 7. a 10. chromozóme. Ak je pozitívny aspoň jeden z týchto markerov alebo akákoľvek ich kombinácia, je tumor označený za „molekulárny glioblastóm", a to i v prípade chýbania mitóz, nekróz či vaskulárnej proliferácie. Existujú teda zriedkavé prípady, keď je histomorfologicky gr. 2 tumor po molekulárnych vyšetreniach označený ako gr. 4.

Autori práce zozbierali súbor pacientov z viacerých pracovísk, ktorí mali rádiologický obraz sugestívny z LG difúzneho gliómu, morfologický obraz bol konzistentný s LG difúznym gliómom, pri IDH negativite a pri genetických vyšetreniach bol identifikovaný aspoň jeden znak „molekulárneho" glioblastómu. Medzi 56 pacientami identifikovali 39 pacientov s mutáciou promótora TERT, z ktorých 12 nemalo EGFR amplifikáciu ani numerické zmeny na 7. a 10. chromozóme. U 10 z nich bola vykonaná metylačná analýza. V 6 prípadoch s MC skóre 0,9 alebo vyšším boli dva klasifikované ako adultný typ difúzneho gliómu, dva ako pediatrický typ glioblastómu, jeden ako adultný typ difúzneho HG gliómu a len jeden prípad ako glioblastóm, IDH nemutovaný. Prípady s izolovanou mutáciou promótora TERT vykazovali signifikantne lepšie prežívanie (na úrovni gr. 3).

Prípady s izolovanou mutáciou promótora TERT sa teda prognosticky líšia od iných „molekulárnych glioblastómov", metylačne netvoria samostatnú skupinu a do budúcna bude pravdepodobne potrebné „molekulárne glioblastómy" redefinovať.

*Zdroj:*

Priesterbach-Ackley LP et al. Diffuse, IDH-wildtype gliomas in adults with minimal histological change and isolated TERT promoter mutation: not simply CNS WHO grade 4. ***Acta Neuropathol*** 2024; (1): 12.

- B. Rychlý -