

# Sekvenování genů 16S, 18S a ITS regionů: Rozšířené možnosti v diagnostice a výzkumu patologie

Veronika Prousková<sup>1</sup>, Iva Dolinová<sup>1</sup>, Kateřina Štillerová<sup>1</sup>, Tomáš Klinger<sup>2</sup>, Tomáš Jirásek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Oddělení molekulární genetiky a diagnostiky, Centrum PATOS, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

<sup>2</sup> Oddělení patologie, Centrum PATOS, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

## SOUHRN

Sekvenování genů 16S, 18S a ITS regionů se stalo jedním z nejdůležitějších nástrojů v molekulární diagnostice, zejména v oblasti mikrobiologie, patologie a soudního lékařství. Výše zmíněné geny, obsahující konzervované i variabilní oblasti, jsou hojně využívány pro taxonomické zařazení bakterií a eukaryot. Sekvenování 16S rDNA umožňuje detekci bakteriálních infekcí, zatímco sekvenace ITS regionů a 18S rDNA je využívána při identifikaci mykotických, případně parazitárních infekcí, a to především v případech, kdy tradiční metody selhávají.

Tento článek se zaměřuje na rozšířené možnosti těchto metod, jejich uplatnění v klinické diagnostice a výzkumu, zkoumá výhody a nevýhody, a diskutuje potenciální budoucí vývoj v oblasti technologie sekvenování nové generace (NGS).

**Klíčová slova:** Sekvenování 16S – Sekvenování 18S – Sekvenování ITS – Diagnostika infekcí – Molekulární patologie – Sekvenování nové generace

## 16S, 18S gene, and ITS region Sequencing: Expanded Applications in Pathology Diagnostics and Research

### SUMMARY

Gene sequencing of 16S, 18S, and ITS regions is a crucial tool in molecular diagnostics, especially in microbiology, pathology and forensic medicine. These genes contain conserved and variable regions and are widely used for the taxonomic classification of bacteria and eukaryotes. Sequencing of 16S rDNA helps detect bacterial infections, while sequencing of ITS regions and 18S rDNA is used to identify fungal or parasitic infections, especially when traditional methods are ineffective.

This article focuses on the expanded possibilities of these methods, their application in clinical diagnostics and research, their advantages and disadvantages, and discusses potential future developments in the field of next-generation sequencing (NGS) technology.

**Keywords:** 16S sequencing – 18S sequencing – ITS region sequencing – Infection diagnostics – Molecular pathology – Next-generation sequencing

*Cesk Patol 2024; 60(3): 176–180*

Technologie sekvenování genů 16S, 18S a ITS regionů přinesly revoluční změnu v molekulární diagnostice, zejména v oblasti mikrobiologie, patologie a soudního lékařství (1).

Přímé sekvenování genu 16S rDNA je schopno prokázat přítomnost bakteriální nukleové kyseliny a na základě získaných dat je možné dourčení mikroorganismu řádově do rodu, v případě dostatečně dlouhé a čisté sekvenace až do druhového pojmenování (2). Gen 16S rDNA kóduje část malé podjednotky prokaryotického ribozomu. Mezidruhově se nachází v různém počtu kopií, ale v rámci jednoho konkrétního bakteriálního druhu je počet kopií stejný. Sekvence genu má přibližně 1500 párů bazí, což znamená, že se jedná o úsek dostatečně dlouhý k identifikaci mikroorganismu, ale přitom optimálně krátký, bylo možno provést Sangerovo sekvenování (3–5). Vyšetření se provádí přímo z klinických vzorků různých materiálů, nejčastěji jsou to punktáty, stěry, biopsie nebo kusy infikovaných tkání (1).

Přímé sekvenování genu 18S rDNA a ITS regionů slouží k detekci eukaryotických mikroorganismů. Jedná se především o identifikaci mykotických infekcí, potencionálně také parazitů.

### ✉ Adresa pro korespondenci:

Ing. Veronika Prousková

Oddělení genetiky a molekulární diagnostiky, centrum PATOS

Husova 1430/34, 460 01, Liberec I – Staré Město

Tel: 485 313 005

E-mail: veronika.prouskova@nemlib.cz

Po sekvenaci je možné zařazení organismu řádově do rodu. Všeobecně je detekce eukaryotických organismů, zejména parazitické DNA, limitována jak z důvodu nízké specifity získaných sekvencí, tak i díky převaze lidské DNA, jejíž zastoupení ve vzorku dominuje (6). Bohužel v tomto případě nelze použít metody k jejímu odstranění, jako tomu může být u diagnostiky bakteriální 16S rDNA. Lidská DNA obsahuje stejný gen 18S rDNA, jaký nacházíme u parazitů nebo hub. Sekvence genu 18S rDNA činí kolem 840 párů bazí (7).

ITS (Internal Transcribed Spacers) regiony se dělí na dva – ITS 1 a ITS 2. Obklopují gen 5.8S a spojují ho s geny 18S (ITS 1) a 26S (ITS 2) (8). Opět se jedná o metodu, kterou dochází k detekování eukaryotické DNA ve vzorku. Délka fragmentu při amplifikaci ITS regionů je variabilní, pohybuje se pod 300 bp/jeden region, v závislosti na použitých primerech a amplifikované oblasti (9). Metoda s použitím ITS regionů má více možností užití od detekce fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy až po identifikaci vícedruhového zastoupení mikroorganismů ve vzorku (oddělení jednotlivých amplifikovaných fragmentů se poté provádí na agarózovém gelu po gelové elektroforéze), ve výsledku se ale nejedná o primární metodu pro detekci extrahované DNA. Tou stále zůstává sekvenace genů 16S a 18S (10).

Metody sekvenace genů 16S a 18S jsou obzvláště účinné při diagnostice infekcí, které nejsou snadno detekovatelné tradičními metodami, jako je kultivace, mikroskopie nebo PCR (11).

Sekvenování nové generace (NGS) umožňuje analýzu mnoha vzorků naráz s velkou přesností, což umožňuje rychlou a efektivní detekci infekčních agens, které by jinak zůstaly neodhaleny