

s různou závažností symptomů dolních močových cest (DMC) při benigní hyperplazii prostaty (5) nebo u pacientů s karcinomem močového měchýře a zdravými kontrolami (6).

Zatímco bakteriom močového traktu postupně odkrýváme, virom močových cest je zatímka neznámý. Většina informací o močovém viromu je známa díky studiím na pacientech po transplantaci ledviny, u kterých BK polyomavirus (BKV) způsobuje nefropatii štěpu asociovanou s polyomavírovou infekcí (7). Většina virů obsažených v moči jsou bakteriofágy – viry infikující bakterie (8), avšak podařilo se detekovat i viry napadající eukaryotní buňky. Z klinického hlediska byla přítomnost polyomavirů spojena s rejekcí štěpu po transplantaci ledviny (9), v ojedinělých studiích také s intersticiální cystitidou (8) nebo hyperaktivním močovým měchýřem (10).

Cílem prezentované pilotní studie bylo zjistit, zda jsou mikrobiální společenství – bakteriom a virom – detekovatelná nejen v dolních, ale i v horních močových cestách (HMC) a pokud ano, tak zda se mikrobiomy horních a dolních močových cest liší.

## SOUBOR PACIENTŮ A METODA

Prezentovaný soubor tvoří část pacientů zařazených do naší studie močového mikrobiomu, jejíž výsledky byly publikovány dříve (11–13). Pacienti podstupovali endoskopický operační zákrok na močových cestách, jehož standardní součástí byla katetrizace HMC. Studie byla schválena nemocniční etickou komisí a všichni pacienti podepsali před odběrem moči informovaný souhlas.

Předoperační kultivace moči byla (s jednou výjimkou pacienta č. 6) negativní. Antibiotická profylaxe byla (opět s jednou výjimkou pacienta č. 2) podávána až po odběru obou vzorků moči. Žádný ze subjektů studie neměl v močových cestách zavedeno cizí těleso, např. stent nebo močovou cévku.

Vzorek moči z močového měchýře, resp. dolních močových cest (DMC) byl odebrán po zarouškování, dezinfekci genitálu a zavedení cystoskopu s použitím lubrikačního gelu bez mikrobicidní

příměsí. Poté byl měchýř naplněn fyziologickým roztokem a do předpokládané oblasti renální pánevičky zavedena 7 F ureterální cévka; později jsme používali 70 cm mono-J stenty. Moč byla odebrána samospádem odkapáním do připravené sterilní zkumavky v množství 5–50 ml. Z provozních důvodů netrval žádný odběr déle než 10 minut. Oba vzorky byly uloženy při 4 °C a týž den zmrazeny a poté uchovány při -20 °C až do extrakce DNA.

K izolaci DNA byl použit Eligene Urine Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR) dle instrukcí výrobce. Hypervariabilní region V4 genu pro bakteriální 16S rRNA byl amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí s primery 515 F a 806R v krocích popsaných dříve (11). Po vytvoření sekvenčních knihoven pomocí nástroje TruSeq DNA PCR-Free LP Kit byla DNA sekvenována na platformě Illumina MiSeq 2x250 bazí (Illumina Inc., San Diego, USA).

Sekvenční data byla analyzována postupem popsaným dříve (12). Po vypuštění dat s nízkou kvalitou byly sekvence seskupeny do operačních taxonomických jednotek (OTU) na úrovni 97% podobnosti, což odpovídá bakteriálnímu druhu. Analýza alfa a beta diverzity byla provedena v prostředí R 4. 2. 0 (14) pomocí balíčku vegan 2.6-2 (15). Byl spočítán počet OTU reprezentujících 95 % celkové bakteriální komunity v každém vzorku, iChao1 (16), ACE (abundance-based coverage estimator) (17), Shannonův a Simpsonův index. Průměrná hodnota rozdílnosti pro jednotlivé skupiny byla spočítána na základě Bray-Curtis distanční matice. Statistické rozdíly byly považovány za signifikantní na úrovni  $p < 0,05$ .

Integrita izolované DNA a přítomnost inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolního genu pro lidský beta globin (18). Poté byla provedena detekce BKV, JC polyomaviru (JCV), torque-teno viru (TTV), viru Epstein-Barr (EBV), lidského cytomegaloviru (HCMV) a adenovirů pomocí kvantitativní PCR (qPCR), HPV byly identifikovány pomocí PCR s následnou reverzní hybridizací na membráně. Pro jednotlivé qPCR byly použity již publikované primery a hydrolyzační próby značené fluorescenční barvou FAM na 5' konci a zhasičem BHQ-1 na 3' konci. Seznam všech primerů a prób je k dispozici u korespondujícího autora na vyžádání. Reakce