

КОНВЕНЦИОНАЛНИ И МОЛЕКУЛАРНИ МЕТОДИ У ДИЈАГНОСТИКОВАЊУ И НАДЗОРУ ВИРУСНИХ ИНФЕКЦИЈА

Маја ЂУПИЋ, Ивана ЛАЗАРЕВИЋ, Александра КНЕЖЕВИЋ, Маја СТАНОЈЕВИЋ

Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд

КРАТАК САДРЖАЈ

Лабораторијско дијагностиковање вирусних инфекција подразумева примену широке палете метода и техника различите осетљивости и специфичности који се данас користе у свакодневној рутинској пракси и научноистраживачком раду. Савремене лабораторијске поступке у вирусологији чине конвенционални и молекуларни методи, при чему ниједан од њих не задовољава апсолутне критеријуме тзв. златног стандарда, који пружа јасну дијагностичку вредност и прецизно указује на развој болести. Изаоловање вируса у културама ћелија, иако не припада рутинским вирусолошким поступцима, јесте поуздан метод који потврђује постојање вируса у клиничком узорку и упућује на његову активну репликацију. Међутим, због посебних услова неопходних за култивацију, као што су очување „живог“ вируса и дуготрајност поступка, културе ћелија се данас ретко користе у свакодневној вирусолошкој дијагностици. Конвенционални методи подразумевају поступке који се рутински примењују у вирусолошкој дијагностици, а могу бити директни (вирусолошки) или индиректни (серолошки). Вирусолошке технике су егзактније од серолошких јер се помоћу њих вирус доказује директно у клиничком материјалу, и то: на основу морфологије, техником електронске микроскопије или доказивањем вирусних антигена имунофлуоресцентним бојењем (*IF*) и имуноензимским тестовима (*ELISA*). Потоња два метода су релативно лака, брза за извођење и специфична, тако да се данас широко примењују у препознавању вируса. Серолошка дијагностика је дуго времена била ослонац у дијагностиковању вирусних инфекција, тако да се и данас најчешће примењује у рутинском раду. Поред многих предности, као што су брзина и начин извођења, обрада великог броја узорака истовремено, могућност одређивања класа антитела специфичних за вирус и њихова квантификација, серодијагностика има и недостатака и ограничења, а то су: релативно мала осетљивост, унакрсна реактивност, недовољна поузданост код имунокомпромитованих болесника. У последње време методи молекуларне биологије имају значајно место у вирусолошкој дијагностици, мада и међу њима постоје разлике у брзини, начину извођења, неопходној опреми, осетљивости и специфичности. Они се заснивају на доказивању дела вирусне нуклеинске киселине хибридизацијом са специфичним пробама, амплификацијом и откривањем умноженог сигнала, а велики значај показују у прецизном постављању дијагнозе вирусног обољења и надгледању успешности антивирусне терапије.

Кључне речи: вирусолошке лабораторијске технике; имунофлуоресцентно бојење (*IF*); имуноензимски тестови (*ELISA*); молекуларни методи; *PCR*; *RT-PCR*

УВОД

Лабораторијско дијагностиковање вирусних инфекција подразумева примену широке палете метода и техника различите осетљивости и специфичности који се данас користе у свакодневној рутинској пракси и научноистраживачком раду. Од тренутка када су вируси откривени као значајни изазивачи инфекција код људи, почело је увођење, а потом и усавршавање, метода за њихово доказивање. Основне одлике вируса као патогена које се односе на њихов облигатни унутарћелијски паразитизам, једноставна и посебна грађа и структура, осетљивост на физичко-хемијске услове, специфични односи које успостављају са ћелијом – утицали су на примену посебних техника за њихово доказивање. Напредак лабораторијских поступака траје до данас, те се почетак овог миленијума може сматрати почетком нове молекуларне ере, која је померила границе откривања ових агенса са нивоа ћелије, антигена, на ниво нуклеинских киселина [1].

Савремене лабораторијске поступке у вирусологији чине конвенционални и молекуларни методи, при чему ниједан од њих не задовољава апсолутне критеријуме тзв. златног стандарда, који би пружио јасну дијагностичку вредност и прецизно указао на развој болести [2]. Избор метода је условљен многим релевантним

параметрима, као што су: клиничка слика болесника, имуни статус, врста клиничког узорка, начин преноса материјала до лабораторије и обраде у њој, али и оним шта се налазом очекује [2, 3]. Овакве поделе поступака који се примењују у лабораторијском дијагностиковању вирусних инфекција не треба стриктно схватити, јер оно што данас подразумева вирусолошку дијагностику јесте скуп метода који су и конвенционални и молекуларни, док, с друге стране, серолошка дијагностика подразумева палету класичних и савремених дијагностичких тестова који се данас најчешће примењују у свакодневном раду вирусолошких лабораторија [4]. Методи који се данас примењују у дијагностиковању и надзору вирусних инфекција се допуњују и прожимају, а често један метод захтева потврду или проверу добијеног налаза другим, ради постављања, односно потврђивања клиничког налаза [5, 6].

КОНВЕНЦИОНАЛНЕ ТЕХНИКЕ У ЛАБОРАТОРИЈСКОМ ДИЈАГНОСТИКОВАЊУ ВИРУСНИХ ИНФЕКЦИЈА

Конвенционални методи подразумевају поступке који се користе у свакодневној лабораторијској пракси, а могу бити директни (вирусолошки) или инди-

ректни (серолошки). Вирусолошке технике су егзактније од серолошких, јер се њима сам вирус или његови антигени доказују у клиничком материјалу. Серолошка дијагностика подразумева доказивање антивирусних антитела, најчешће у серуму, али и у другим телесним течностима у којима се она могу очекивати, те се на тај начин индиректно доказује ранији контакт с вирусом, његово активно или перзистентно постојање у организму болесника.

ДОКАЗИВАЊЕ ВИРУСА ПОСТУПКОМ ИЗОЛОВАЊА У КУЛТУРИ ЋЕЛИЈА

Један од најстаријих метода који је до почетка примене молекуларнобиолошких поступака у вирусолошкој дијагностици носио епитет „златног” стандарда јесте изоловање вируса у системима живих ћелија [7]. Одлика вируса као стриктно унутарћелијских агенса инфекције условила је неопходност различитих система живих ћелија за њихову култивацију *in vitro*. Као најекономичнији се показао поступак изоловања вируса у култури ћелија, односно узгајаним ћелијама људског или животињског порекла *in vitro*. Он, иако не припада рутинским вирусолошким поступцима, јесте поуздан и високоспецифичан метод који потврђује постојање вируса у клиничком узорку и упућује на његову активну репликацију [8, 9]. Оно што га чини непогодним за свакодневну праксу јесу посебни услови потребни за култивацију вируса *in vitro*: постојање ћелијских линија осетљивих на дати вирус, неопходни услови за нормалан раст и размножавање ћелија – адекватна температура, повећан парцијални притисак угљен-диоксида, влажност итд. И неки други фактори, као што су очување „живог” вијабилног вируса у довољној количини у узорку, обезбеђивање адекватних услова биозаштите у раду са живим патогенима и дуго време потребно за извођење овог метода, такође условљавају да се овај поступак потисне из рутинске праксе. Поред тога, изоловањем вируса се доказује његово постојање у клиничком узорку, али се његово препознавање мора извршити другим методима, најчешће онима за доказивање антигена, као што је имунофлуоресценција (IF). Најважнија предност изоловања вируса огледа се у могућности да се изоловани вирус може користити за даља истраживања, пре свега за испитивање осетљивости на антивирусне лекове [10, 11].

ДОКАЗИВАЊЕ ВИРУСА НА ОСНОВУ МОРФОЛОГИЈЕ ТЕХНИКОМ ЕЛЕКТРОНСКЕ МИКРОСКОПИЈЕ

Применом технике електронске микроскопије (ЕМ) и имуноелектронске микроскопије (ИЕМ) вируси се могу доказати на основу свог типичног изгледа: облика и величине честице, симетрије капсида, броја

капсомера, постојања или изостанка омотача. Иако се ове технике лако и брзо изводе, њихови бројни недостаци, као што су скупа опрема (електронски микроскоп), слаба осетљивост (потребна количина вируса већа од 10^7 вириона по милилитру узорка), искуство при микроскопирању, те могућност доказивања вируса само до нивоа фамилије, потиснули су технику ЕМ из свакодневне вирусолошке дијагностике. Ипак, њена примена је још заступљена код лабораторијске потврде вирусних гастроентеритиса изазваних ротавирусима, калицивирусима или астровирусима и постављања дијагнозе вирусних инфекција са везуколом оспом (поксвируси, херпесвируси) [12, 13].

ДОКАЗИВАЊЕ ВИРУСА НА ОСНОВУ ВИРУСНИХ АНТИГЕНА ПРИМЕНОМ ТЕХНИКА ИМУНОСТИ

Доказивање вируса на основу његових антигена заснива се на високоспецифичном везивању антитела за вирусне антигене. Рутински се примењују тестови директне имунофлуоресценције (DIF), индиректне имунофлуоресценције (IIF) и имуноензимски тестови (на пример, ELISA) [14]. Методи IF и ELISA се једноставно и брзо изводе и релативно су високо специфични, али се, због ограничене осетљивости, сврставају у групу брзих метода за скрининг, који захтевају примену поузданијих тестова за потврду дијагнозе [15, 16].

СЕРОЛОШКО ДОКАЗИВАЊЕ ВИРУСНИХ ИНФЕКЦИЈА: ИНДИРЕКТНА ДИЈАГНОСТИКА

Серолошка дијагностика се данас најчешће примењује у рутинском раду вирусолошких лабораторија. Подразумева доказивање антитела специфичних за вирус у серуму или другим телесним течностима, чиме се на индиректан начин доказује вирусна инфекција. Постоји велики број серолошких тестова: од класичних (нпр. тест неутрализације), којима се не могу одредити класе антитела, до савремених, код којих су многи недостаци класичних серолошких тестова превазиђени [17].

Осим великог броја предности, као што су брзина и начин извођења, могућност обраде великог броја узорака истовремено, одређивања класа антитела специфичних за вирус и њихове квантитације, серодијагностика има и недостатке и ограничења: релативно мала осетљивост, унакрсна серолошка реактивност код сродних вируса, слаб серолошки одговор код неких вирусних инфекција, недовољна поузданост код имунокомпромитованих болесника итд. У последње време примењују се савремени ELISA тестови, чији је праг откривања антивирусних антитела значајно нижи од претходних генерација серолошких тестова

ва, чиме је њихова осетљивост повећана, а тиме и дијагностичка вредност [18, 19].

Посебан значај имају потврдни тестови, као што је *Western blot test*, чија је примена за потврду налаза добијеног тестом *ELISA* неопходна у постављању дијагнозе неких вирусних инфекција (инфекције вирусом хумане имунодефицијенције – *HIV*, инфекције вирусом хепатитиса *C* – *HCV*) [20]. У откривању конгениталних, перинаталних, односно вирусних инфекција које се често јављају у периоду после пресађивања органа или ткива (на пример, цитомегаловирусна инфекција – *CMV*) важну улогу имају тестови авидитета, којима се утврђује јачина везе између антигена и откривених антивирусних антитела, чиме се индиректно потврђује тренутна, односно раније прележана вирусна инфекција [21, 22].

МОЛЕКУЛАРНИ МЕТОДИ У ЛАБОРАТОРИЈСКОМ ДИЈАГНОСТИКОВАЊУ ВИРУСНИХ ИНФЕКЦИЈА

Иако међу конвенционалним тестовима постоје разлике у брзини, начину извођења, потребној опреми, осетљивости и специфичности, ограничена осетљивост је њихов највећи недостатак, који је превазиђен применом метода молекуларне биологије у вирусолошкој дијагностици. Они се заснивају на доказивању вирусне нуклеинске киселине хибридизацијом са специфичним пробама, амплификацијом или откривањем умноженог сигнала [23, 24].

Методи хибридизације нуклеинске киселине се заснивају на директном доказивању нуклеинских киселина без претходног умножавања. Циљна тачка може бити вирусна ДНК или РНК, која се доказује или директно у интактним ћелијама, као код хибридизације *in situ*, или се нуклеинске киселине претходно екстрахују, као код блот-метода (*Dot blot*, *Southern blot*, *Northern blot*). Методи хибридизације су мање осетљиви од техника амплификације, захтевају већу концентрацију нуклеинских киселина у узорку, квалитативне су, релативно сложене за извођење и захтевају посебне лабораторијске услове (блот-технике) [23, 25].

Велики значај у прецизном постављању дијагнозе вирусног обољења и могућност разликовања активне од латентне вирусне инфекције показују технике амплификације вирусног генома. Најважније у овој групи су реакција ланчаног умножавања (енгл. *polymerase chain reaction* – *PCR*), чији је циљ доказивање вирусне ДНК, и *PCR* са реверзном транскрипцијом (*RT-PCR*), који се користи за доказивање вирусне РНК. Метод *PCR* се изводи у три етапе: 1) издвајање нуклеинских киселина из материјала болесника; 2) амплификација жељеног сегмента ДНК; и 3) препознавање *PCR* продукта електрофорезом у гелу. Метод се заснива на умножавању жељене секвенце ДНК помоћу термостабилне ДНК полимеразе (*Taq* полимеразе) и одговарајућих олигонуклеотида који су комплемен-

тарни за крајеве жељене секвенце (прајмери). Умножавање се одвија великим бројем (30–40) цикличних понављања три основне фазе: фазе денатурације почетних двоструких ланаца ДНК, фазе везивања одговарајућих прајмера и фазе синтезе нових ланаца ДНК. Резултат реакције *PCR* се читава електрофорезом добијеног *PCR* продукта у агарозном гелу, где се умножена циљна секвенца ДНК препознаје на основу своје величине.

Висока осетљивост и специфичност амплификационих молекуларних метода омогућила им је да понесу епитет „златног” стандарда, чија је предност, поред наведених, и квантитација вирусне нуклеинске киселине – тзв. *viral load*. Квантитација нуклеинских киселина има посебан значај у савременој вирусолошкој дијагностици, јер је број копија вирусног генома у клиничком узорку у директној корелацији с обимом репликације вируса и упућује на могући клинички ток инфекције, прогнозу болести и надгледање успеха лечења [6, 26]. У квантитацији нуклеинских киселина примат данас има метод *PCR* у тзв. стварном времену (енгл. *real time*), којим се истовремено врше умножавање и квантитација ДНК. Специфично умножавање секвенце ДНК овом методом врши се на уобичајен начин, али се после сваког циклуса умножавања обавља и квантитација ДНК. Осим усавршавања квантитације, овај метод надмашује класични *PCR* великом осетљивошћу и брзином извођења. Да би се избегло мешање термина *RT-PCR* (*PCR* са реверзном транскрипцијом) и *PCR* у стварном времену, овај други се често означава као квантитативни *PCR* или *RTQ-PCR* (енгл. *real-time quantitative PCR*) [24]. Брзина добијања резултата, већа осетљивост и једноставно одређивање тзв. *viral load* овај метод данас чине веома важним у надгледању особа с *HIV*, оболелих од хроничног хепатитиса *B* и *C* и праћењу вирусних инфекција (*CMV* и осталих инфекција херпесвирусом) код имунокомпромитованих болесника.

У технике сигналне амплификације убраја се метод „хватања” хибрида (енгл. *hybrid capture assay*) и техника „разгранате ДНК” (енгл. *branched-chain DNA* – *bdna*), које се не заснивају на умножавању циљне нуклеинске киселине, већ на хибридизацији са већим бројем обележених проба („умножавање сигнала”). Овим методима се могу открити вирусне ДНК или РНК, а могу бити квалитативне или квантитативне (на пример, одређивање нивоа *HIV* или *HCV* РНК) [27, 28]. У техници „хватања” хибрида вирусна ДНК из узорака хибридизује с одговарајућом РНК пробом, а затим тај ДНК–РНК хибрид бива „ухваћен” антиелима која се налазе у чврстој фази. Тако „ухваћен” хибрид се визуелизује специфичним антителима која су обележена ензимом. Свако антитело је обележено великим бројем молекула ензима, а за сваки хибрид се везује велики број ових антитела. На тај начин се постиже умножавање сигнала, који се после примене супстрата мери луминометром. Пошто је количина емитоване светлости пропорционална количини

ДНК у узорку, метод је и квантитативан. Резултат се изражава као број пикограма ДНК по милилитру (*pg/ml*), а може се претворити и у број копија генома по милилитру [27]. Код технике „разгранате ДНК” вирусна нуклеинска киселина хибридује с одговарајућом пробом у чврстој фази, а затим другим својим делом и са „разгранатим” молекулом ДНК (енгл. *branched DNA – bDNA*), који служи као основа за умножавање сигнала, јер за његове гране хибридује велики број проба које су обележене ензимом. После додавања одговарајућег супстрата емисија светлости се мери луцинометром [28].

Савременој вирусолошкој дијагностици припадају и поступци секвенцирања вирусног генома после амплификације, који омогућавају његову прецизну анализу, утврђивање генотипа вируса, постојања грешака и настанак мутација у вирусном геному, одређивање молекуларне основе резистенције на антивирусне лекове, као и филогенетску анализу изолата [29].

ЗАКЉУЧАК

У савременим принципима дијагностиковања вируса молекуларне технике преузимају водећу улогу. Ово не искључује улогу дијагностичку примену и значај конвенционалних метода, тако да избор адекватног дијагностичког поступка зависи од много параметара и најчешће подразумева истовремену примену неколико метода.

ЛИТЕРАТУРА

- Flint SJ, Enquist LW, Rancicello VR, Skalka AM editors. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 2003.
- Lennet EH, editor. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1999.
- Forbes BA, Weissfeld AS, Sahm DF, editors. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St Louis: Mosby; 2002.
- Virology on the Internet and specific viruses: Available at: www.virology.net/garryfavwebindex.html
- Storch GA, editor. Essentials of Diagnostic Virology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 2000.
- Lazarević I, Stanojević M, Čupić M, Jovanović T. Značaj PCR metode u određivanju prisustva citomegalovirusa u krvi i urinu pacijenata u posttransplantacionom periodu. Acta Chir Jugosl 2006; 53(1):19-22.
- Stabell EC, Olivo EC. Isolation of a cell line for rapid and sensitive histochemic assay for detection of herpes simplex virus. J Virol Methods 1992; 38(2):195-204.
- Sewell DL, Horn SA, Dilbeck PW. Comparison of Cultureset and Bartels Immunodiagnosics with conventional tissue culture for isolation and identification of herpes simplex virus. J Clin Microbiol 1984; 19(5):705-6.
- Hughes JH, Mann DR, Hamparian AA. Viral isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Microbiol 1986; 24(3):487-9.
- Cann AJ editor. Virus Culture: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 1999.
- Viruses in cell culture: Available at: www.uct.ac.za/depts/mmi/stanard/linda.html
- Ong H, Chandran V. Identification of gastroenteric viruses by electron microscopy using higher order spectral features. J Clin Virol 2005; 34(3):195-206.
- Arcangeletti MC, De Conto F, Pinarid F, et al. Electron microscopy as a reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agents: a five-year experience report. Acta Biomed Ateneo Parmense 2005; 76(3):165-70.
- Čupić M. Laboratorijska dijagnostika Herpes simplex virus infekcija. Acta Ophthalmol Jug 2002; 28:21-6.
- Lazarević I, Jovanović T, Stanojević M, Čupić M. Comparison of methods for CMV detection in urine of immunocompromised patients. 2nd European Congress of Virology, Madrid, Spain, Abstract book, 2004. p.18.3.
- Ranin J, Perović M, Čupić M, Žerjav S, Salemović D, Jevtović Đ. Lumbosakralna poliradikulopatija izazvana citomegalovirusom kod pacijenata sa sindromom stečene imunodeficijencije. Acta Infectologica Yugoslavica 2000; 5:173-8.
- Storch GA. Diagnostic Virology. Clin Infect Dis 2000; 31(3):739-51.
- Wald A, Ashley-Morrow R. Serological testing for herpes simplex (HSV-1) and (HSV-2) infection. Clin Infect Dis 2002; 35(Suppl 2):173-82.
- Brown ZA, Corey L, Ashley R, Zeh J, Selke S, Wald A. Effect of viral shedding, serologic status and abdominal deliveries on transmission rates of HSV from mother to infant. JAMA 2003; 289(2):203-9.
- Emmons WW, Paparello SF, Decker CF, Sheffield JM, Lowe-Bey FH. A modified ELISA and western blot accurately determine anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies in oral fluids obtained with a special collecting device. J Infect Dis 1995; 171(6):1406-10.
- Hogrefe W, Su X, Suong J, Ashley R, Kong L. Detection of herpes simplex virus type 2 – specific immunoglobulin G antibodies in Arrican sera by using recombinant gG2 Western blotting, and gG2 inhibition. J Clin Microbiol 2002; 40(10):3635-40.
- Morrow RA, Friedrich D, Krantz E, Wald A. Development and use of a type-specific antibody avidity test based on herpes simplex virus type 2 glycoprotein G. Sex Trans Dis 2004; 31(8):508-15.
- Diagnostic methods in virology: Overview of diagnostic method. Available at: <http://virology-online.com/general/Tests.htm>
- Jovanović T, Čupić M, Stanojević M, Knežević A, Lazarević I. Osnove molekularne virusologije. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2005.
- Persing DH. In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993.
- Suvajdzic N, Čemerikić-Martinović V, Šaranović Đ, Petrović M, Popović M, Artiko V, Čupić M, Elezović I. Littoria-cell angioma as a rare cause of splenomegaly. Clin Lab Haem 2006; 28:317-20.
- Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, et al. Multicenter comparison of the Digene Hybrid Capture CMV DNA Assay (Version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. J Clin Microbiol 1999; 37(4):958-63.
- Chernoff DN, Miner RC, Hoo BS, et al. Quantification of cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes by a branched-DNA signal amplification assay. J Clin Microbiol 1997; 35:2740-4.
- Lazarević I, Čupić M, Delić D, Jovanović T. Genotipizacija hepatitis B virusa. V kongres medicinske mikrobiologije sa međunarodnim učesćem – MICROMED, Beograd, Zbornik radova; 2006. p.169-170.

CONVENTIONAL AND MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS AND MONITORING OF VIRAL INFECTION

Maja ĆUPIĆ, Ivana LAZAREVIĆ, Aleksandra KNEŽEVIĆ, Maja STANOJEVIĆ

Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade

ABSTRACT

Laboratory diagnosis of viral infections comprises a spectre of methods and techniques with different sensitivity and specificity that are used in routine and research laboratory work. Modern laboratory procedures in virology can be divided in two groups: conventional and molecular methods. Although some of them are widely used, none deserves the title "gold standard" for its diagnostic and prognostic value. Viral isolation in cell culture is now considered a non-routine method. A virus can be detected and initially identified through observation of virus-induced characteristic morphology changes in inoculated cells. Although isolation is a highly specific method, it has many limitations. Today, the existence of other, more rapid and sensitive techniques, confines viral isolation only to research work. Conventional techniques also include: identification of viruses based on their morphology by electron microscopy (EM), viral antigen detection using the immunofluorescence (IF) or immunoenzyme methods (ELISA). All the above-mentioned conventional methods have lower sensitivity and unreliability as disadvantages when compared to modern, molecular methods. Serological diagnosis of viral infections is used very widely in routine laboratory work. Besides

many advantages, such as rapidity, possibility of testing many samples at the same time, the ability to determine classes and types of antibodies as well as titres, serodiagnosis has many limitations. Recently, molecular methods have become more and more important in laboratory diagnosis of viral diseases. These methods are based on detection of viral nucleic acids by hybridisation with specific probes or amplification of the conserved regions of viral genome by PCR. These techniques are especially useful for detection of latent infections and in determining the success of antiviral therapy.

Key words: viral laboratory techniques; IF test; ELISA test; molecular methods; PCR; RT-PCR

Maja ĆUPIĆ
Institut za mikrobiologiju i imunologiju
Medicinski fakultet
Dr Subotića 1, 11000 Beograd
Tel.: 011 2685 961
Faks: 011 2656 950
E-mail: tajm@eunet.yu