

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA INFEKTIVNIH BOLESTI

SNJEŽANA ŽIDOVEC LEPEJ*

Molekularne metode neizostavni su dio suvremene kliničke dijagnostike infektivnih bolesti zbog visoke osjetljivosti, specifičnosti i mogućnosti testiranja unutar klinički relevantnog vremena. U molekularnim laboratorijima najčešće se primjenjuju standardizirani testovi koji se temelje na metodama lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, PCR), hibridizaciji nukleinskih kiselina i sekvenciranju važnih regija genoma. Metode molekularne dijagnostike u području infektivnih bolesti koriste se za detekciju i/ili kvantifikaciju nukleinskih kiselina mikroorganizama u svrhu dokazivanja infekcije i indirektnog praćenja kinetike replikacije kao i za analizu rezistencije mikroorganizama te genotipizaciju.

Deskriptori: INFEKTIVNE BOLESTI, DIJAGNOSTIKA, PCR, HIBRIDIZACIJA, SEKVENCIONIRANJE

UVOD

Molekularne metode neizostavni su dio suvremene kliničke dijagnostike infektivnih bolesti zbog visoke osjetljivosti, specifičnosti i brzine testiranja (1-4). U kliničkim laboratorijima najčešće se koriste metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, PCR), hibridizacijske metode i sekvenciranje nukleinskih kiselina. Posebno valja istaknuti da molekularne metode omogućavaju dokazivanje infekcije mikroorganizmima koji se ne mogu kultivirati kao i onih kod kojih je kultivacija tehnički zahtjevna ili dugotrajna odnosno ne daje rezultat unutar klinički relevantnog vremena (1-2). Molekularne metode iskazuju iznimnu osjetljivost te omogućuju dokazivanje infekcija s vrlo malim brojem uzročnika. Obzirom na to da su ciljne strukture molekularnih testova DNA ili RNA, vijabilnost mikroorganizma nije

preduvjet testiranja. Stoga se molekularni testovi uspješno koriste za dokazivanje infekcije u bolesnika kod kojih je već ranije započela empirijska antimikrobna terapija (1-3). Molekularni testovi mogu biti dizajnirani kao kvalitativni ili kvantitativni, a najčešće se primjenjuju za detekciju nukleinskih kiselina u svrhu dokaza infekcije nekim mikroorganizmom, praćenje tijeka bolesti kao i procjenu učinka liječenja (1-4). Molekularne metode važan su dio dijagnostičke obrade brojnih infektivnih bolesti od kojih se posebno ističu:

- dijagnostika pandemijskih virusa tj. virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1), virusa hepatitisa B (HBV) i C (HCV);
- dijagnostika uzročnika spolno prenosivih infekcija kao dio programa praćenja ženskog zdravlja (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, humani papilomavirusi);
- dijagnostika respiratornih infekcija;
- dijagnostička obrada bolesnika liječenih transplantacijom;
- dijagnostika neurotrofnih virusa u cerebrospinalnom likvoru;
- molekularna dijagnostika sepse.

Cilj ovog rada je prikazati molekularne metode koje se najčešće primjenjuju u dijagnostičkoj obradi osoba oboljelih od infektivnih bolesti, poglavito djece (1-6).

Molekularna dijagnostika uzročnika infekcija središnjeg živčanog sustava (SZS)

Suvremena dijagnostika uzročnika infekcija SZS-a u cerebrospinalnom likvoru (CSF) temelji se na primjeni PCR-a u stvarnom vremenu koji omogućuje identifikaciju nukleinskih kiselina uzročnika infekcije unutar 2-3 sata (5). Molekularne metode posebno su značajne u području dijagnostičke obrade virusnih infekcija SZS-a. Infectious Diseases Society of America (IDSA) preporučuje da se u dijagnostičkoj obradi SZS infekcija imunokompetentnih osoba PCR-om analizira prisutnost DNA herpes simplex virusa - 1/2 (HSV-1/2), varicella-zoster virusa (VZV), Epstein-Barrovog virusa (EBV) i enterovirusne RNA (5). U imunokompromitiranih bolesnika preporučuje se dodatna detekcija/kvantifikacija DNA citomegalovirusa (CMV), JC virusa, virusa zapadnog Nila (WNV) i humanog herpesvirusa 6 (HHV-6) molekularnim metodama (5).

*Odjel za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

Adresa za dopisivanje:
Dr. sc. Snježana Židovec Lepej
Odjel za staničnu imunost i molekularnu dijagnostiku
Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"
10000 Zagreb, Mirogojska 8
E-mail: snjezana.zidovec.lepej@bfm.hr

Molekularna detekcija pan-enterovirusne RNA u CSF-u danas je neizostavni dio dijagnostičke obrade bolesnika s aseptičkim meningitisom uzrokovanim non-polio enterovirusima (NPEV) (6). Najčešće se koriste kvalitativni pan-enterovirusni testovi čija je ciljna struktura konzervirana 5' netranslatirajuća regija genomske RNA. Navedeni testovi omogućuju detekciju pan-enterovirusne RNA u CSF-u unutar 24h od uzorkovanja.

Najsuvremenija generacija pan-enterovirusnih testova temelji se na GeneXpert tehnologiji (Cepheid, Sunnyvale, USA) koja se sastoji od potpuno automatizirane izolacije nukleinskih kiselina te izvođenja višestrukog pan-enterovirusnog PCR-a u samo 2.5 sata (7). Validacijske su studije pokazale da ovaj test detektira 63 serotipa enterovirusa s granicom detekcije od 0,0002 to 200 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose).

Klasične metode kultivacije enterovirusa *in vitro* ne primjenjuju se u rutinskoj dijagnostičkoj obradi bolesnika s enterovirusnim meningitisom jer iskazuju nižu osjetljivost u usporedbi s molekularnim metodama i daju rezultat izvan klinički relevantnog vremena (oko 7 dana) (6). Međutim, metoda kultivacije je značajna za praćenje distribuciju enterovirusa u populaciji. Molekularna heterogenost enterovirusa analizira se sekvenciranjem pojedinih regija virusa i primjenjuje se u epidemiološkim istraživanjima.

U molekularnoj dijagnostici infekcije s HSV-1/2 primjenjuju se PCR testovi u stvarnom vremenu (5). The International Herpes Management Forum (IHMF) je 2004. g. izradio preporuke prema kojima je detekcija HSV DNA u cerebrospinalnom likvoru PCR-om metoda izbora za dijagnostiku HSV encefalitisa (8). Metoda kultivacije se primjenjuje samo u dijagnostičkoj obradi neonatalnog herpesa, dok se analiza intratekalne sinteze protutijela specifičnih za HSV preporučuje u dijagnostičkoj obradi bolesnika kod kojih je lumbalna punkcija učinjena tek nekoliko dana nakon pojave neuroloških simptoma a rezultat PCR-a je negativan (8). IHMF također preporučuje ponoviti PCR na HSV-1/2 DNA u CSF-u nakon

završetka liječenja kako bi se potvrdila eliminacija replicirajućeg virusa (8-9).

Preporuke Infectious Diseases Society of America (IDSA) iz 2008. g. također navode da se uzorci CSF-a svih bolesnika s encefalitisom moraju testirati na prisutnost HSV-1/2 DNA PCR-om (5).

Klinička korisnost detekcije HSV-1/2 ovisi o vremenu uzorkovanja CSF-a. U većine odraslih imunokompetentnih bolesnika PCR-om se može detektirati HSV DNA neposredno nakon pojave prvih simptoma te tijekom prvog tjedna antiviralnog liječenja zbog povećanja broja fragmenata DNA u CSF-u (5, 8).

Nekoliko studija je pokazalo da se HSV DNA u CSF-u može uspješno detektirati PCR-om 1-3 dana nakon započinjanja antivirusnog liječenja čak i u bolesnika kod kojih je prvi PCR bio negativan (10-12). Stoga IDSA preporučuje da se u bolesnika s kliničkom dijagnozom HSV encefalitisa i negativnim PCR-om prije liječenja ponovi testiranje nakon 3-7 dana primjene aciklovira te da se negativan rezultat drugog PCR-a koji je učinjen tijekom liječenja može smatrati kriterijem za prekid liječenja (5).

Mejias i sur. (2009) su analizirali kliničku značajnost opetovano pozitivnog PCR-a na HSV-1/2 DNA u CSF-u novorođenčadi nakon 15-21 dana terapije i pokazali da postoji potreba opsežnijih studija o učestalosti i kliničkoj značajnosti perzistentno pozitivnog PCR-a na HSV u djece (13).

Tang i sur. (1999) su analizirali prisutnost HSV-1/2 DNA u 209 uzoraka CSF-a s normalnim brojem leukocita i koncentracijom proteina PCR-om na i svi su uzorci bili negativni (14). Stoga se molekularno testiranje likvora u kojem nisu otkrivene citološke i biokemijske promjene ne preporučuje u rutinskoj dijagnostici (14).

U odraslih imunokompetentnih osoba osjetljivost PCR-a u dijagnostici HSV encefalitisa kreće se od 96-98%, dok je specifičnost (ovisno o metodi) u rasponu od 95-99% (8). Literaturni podatci o osjetljivosti i specifičnosti PCR-a na HSV-1/2 u novorođenčadi i djece su varijabilni a osjetljivost molekularnih metoda procjenjuje se na 75-100% (9).

Kliničku značajnost molekularne detekcije nekih virusa u CSF-u potrebno je pažljivo interpretirati. Primjerice, VZV DNA može se uspješno detektirati u CSF-u no negativan rezultat ne smatra se dostatnim kriterijem za isključivanje encefalitisa. EBV DNA u CSF-u se također može uspješno detektirati i kvantificirati no dokaz replikacije virusa ne ukazuje uvijek na aktivnu CNS infekciju već može biti rezultat replikacije virusa u latentno zaraženim mononuklearnim stanicama te je rezultate potrebno interpretirati u kontekstu kliničke slike i rezultata serološke analize (5).

Molekularna dijagnostika sepse

Cilj primjene molekularnih metoda u dijagnostici sepse je povećanje osjetljivosti testiranja u usporedbi s klasičnim mikrobiološkim tehnikama, skraćivanje vremena testiranja te smanjenje inhibicijskog učinka antibiotika na detekciju patogena (1-3). Od 2007. g. u Europi je dostupan prvi standardizirani test za molekularnu dijagnostiku sepse koji je odobren za *in vitro* dijagnostičku primjenu (LightCycler SeptiFast test, Roche Diagnostics) (15).

Test se temelji na metodi višestrukog PCR-a u stvarnom vremenu i omogućuje detekciju DNA 25 najčešćih uzročnika sepse u perifernoj krvi za samo 6 sati (15). Test detektira DNA Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*), Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Coagulase-negative Staphylococci*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*) i gljiva (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*) (15). Granica detekcije za koagulaza negativni stafilokok, *C. glabrata* i *Streptococcus spp.* iznosi 100 CFU/ml (colony forming unit) odnosno 30 CFU/ml za ostale patogene. SeptiFast test detektira DNA živih i mrtvih mikroorganizama kao i genomske

fragmente te može uspješno identificirati uzročnika sepse i u bolesnika kod kojih je već započeta preemtivna antimikrobna terapija.

Analitičke i kliničke validacije SeptiFast testa pokazale su značajno veću osjetljivost ovog molekularnog testa u usporedbi s klasičnim mikrobiološkim metodama, posebice u dijagnostici polimikrobnih sepsi i gljivičnih infekcija (npr. *Aspergillus fumigatus*) imunokompromitiranih bolesnika. Većina dosadšnjih studija analizirala je kliničku korisnost SeptiFast testa u odraslih bolesnika s kliničkom dijagnozom sepse, bolesnika s endokarditisom, bolesnika liječenih u jedinicama intenzivne medicine te bolesnika liječenih transplantacijom (15-19). Literaturni podatci o primjeni molekularne dijagnostike sepse u djece su oskudni. Mussap i sur. su 2007. g. dokazali primjenjivost SeptiFast testa u dijagnostičkoj obradi novorođenačke sepse (15).

Molekularna dijagnostika respiratornih patogena

Razvoj molekularnih metoda koje omogućavaju istovremenu detekciju nukleinskih kiselina više različitih uzročnika potaknuo je razvoj brojnih standardiziranih testova za dijagnostiku većeg broja respiratornih patogena (6). Suvremena dijagnostika respiratornih virusa najčešće se temelji na testiranju panela koji detektira nukleinske kiseline različitog broja patogena (20-21). Osnovni molekularni panel respiratornih virusa najčešće uključuje detekciju nukleinskih kiselina respiratornog sincicijskog virusa tipa A i B, virusa influence tipa A (H1 i H3) i B te H1N1 soja karakteriziranog 2009. g. dok prošireni panel najčešće uključuje i detekciju humanog metapneumovirusa, virusa parainfluence 1-3, rinovirusa i adenovirusa (20-21). Primjena molekularnih metoda u dijagnostici respiratornih virusa ima značajne prednosti u usporedbi s drugim metodama od kojih valja izdvojiti veću osjetljivost u usporedbi s klasičnim dijagnostičkim metodama (DFA ili metoda kultivacije), brzinu testiranja i mogućnost detekcije virusa koji se ne mogu jednostavno kultivirati u rutinskim laboratorijima. Međutim, molekularna detekcija panela respiratornih

virusa ima i određena ograničenja jer je dostupna isključivo u specijaliziranim laboratorijima i značajno je skuplja od primjerice DFA metode.

Od 2009. g. do danas pojavio se veći broj testova za molekularnu dijagnostiku influence koji najčešće uključuju istovremenu detekciju RNA virusa influence A (H1 i H3), influence tipa B i H1N1 (22-27). Većina standardiziranih testova za molekularnu dijagnostiku influence uključuje automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina iz obrisaka nazofarinksa ili aspirata što značajno smanjuje mogućnost kontaminacije tijekom manualne izolacije nukleinskih kiselina te skraćuje vrijeme testiranja. Od 2010. g. dostupan je i prvi potpuno automatizirani molekularni test za dijagnostiku influence (uključujući i H1N1) na GenXpert tehnologiji koji se u praksi najčešće primjenjuje za brzu dijagnostičku obradu bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja te imunokompromitiranih bolesnika (27).

Osim molekularnih testova koji detektiraju čitav panel respiratornih virusa, dostupni su nam i PCR testovi u stvarnom vremenu koji detektiraju nukleinske kiseline pojedinih respiratornih patogena. Prednost ovog tipa testiranja jest mogućnost ekonomski racionalne ciljane dijagnostike (primjerice detekcija H1N1 tijekom pandemije) te činjenica da testovi koji zasebno detektiraju nukleinske kiseline pojedinih patogena imaju bolju specifičnost i osjetljivost. Primjerice, u nekim standardiziranim panelima respiratornih virusa početnice za detekciju rinovirusa iskazuju određenu križnu reakciju s enterovirusima. Također je važno istaknuti da većina molekularnih testova koji uključuju testiranje panela respiratornih virusa nije validirana za primjenu u imunokompromitiranih osoba.

Molekularne metode primjenjuju se i u dijagnostici drugih uzročnika respiratornih infekcija djece od kojih za potrebe ovog članka izdvajamo molekularnu dijagnostiku pertusisa. Dostupnost PCR-a u stvarnom vremenu za detekciju DNA *Bordetella pertussis* u obrisima nazofarinksa i aspiratima djece omogućila je brzu etiološku dijagnostiku ove bolesti unutar klinički relevantnog vremena (2-

3 h) (28-31). Od 1980. g. do danas objavljeno više od 100 različitih protokola za molekularnu detekciju B. pertussis DNA odnosno za istovremenu detekciju DNA B. pertussis i B. parapertussis (28-31). Ciljne strukture molekularnih testova opisanih u literaturi najčešće su IS481 gen, promotorska regija PT gena, gen za adenilat ciklazu i gen za porin dok je najčešća ciljna struktura gena za B. parapertussis IS1001 gen (28-31). U kliničkim laboratorijima danas se najčešće koriste standardizirani testovi koji istovremeno mogu detektirati DNA B. pertussis i B. Parapertussis (29).

Literaturni podatci dokazuju visoku osjetljivost (94%) i specifičnost (97%) PCR-a za detekciju B. pertussis DNA (32-34). Jedna od najopsežnijih studija koja je analizirala osjetljivost PCR-a i metode kultivacije u dijagnostici infekcije s B. pertussis i parapertussis provedena je u Danskoj i obuhvatila je 3096 hospitaliziranih bolesnika praćenih tijekom 3 godine (33). Rezultati studije pokazali su da je osjetljivost metode kultivacije bila 58%, dok je osjetljivost PCR-a bila 97% (33).

Preduvjet uspješne primjene i interpretacije molekularne dijagnostike pertusisa je utvrđivanje dužine respiratornih simptoma. U bolesnika kod kojih su respiratorni simptomi kraći od 2 tjedna preporučuje se primjena molekularne dijagnostike dok se u bolesnika kod kojih respiratorni simptomi traju od 2-4 tjedna u dijagnostici mogu koristiti molekularne i serološke metode (32). U bolesnika kod kojih respiratorni simptomi traju duže od 4 tjedna ne preporučuje se molekularna dijagnostika već isključivo serološke metode (PCR će tada biti najčešće negativan) (32).

Literaturni podatci o osjetljivost molekularne detekcije B. pertussis DNA u djece tijekom antimikrobnog liječenja su oskudni. Bidet i sur. (2008.) su analizirali prisutnost B. pertussis DNA u aspiratima nazofarinksa 22 djece tijekom antimikrobnog liječenja i pokazali da je u 21/22 djece PCR bio pozitivan nakon 5 dana liječenja (35). Nakon čak 14 dana liječenja, B. pertussis DNA bila je detektibilna u aspiratima u čak 10 od 12 djece što pokazuje da se molekular-

ne metode uspješno mogu primijeniti i u dijagnostičkoj obradi djece kod kojih je započelo antimikrobno liječenje (35).

Molekularna dijagnostika herpesvirusa

Molekularne metode najčešće se primjenjuju za kvantifikaciju DNA EBV-a, CMV-a Parvovirusa B19 i humanog herpesvirusa 6 (HHV-6) u različitim biološkim uzorcima (krv, plazma, CSF) (6-3). Kvantifikacija CMV DNA u dijagnostičkom je smislu iznimno značajna u praćenju rizika od nastanka posttransplantacijske CMV-bolesti i ranog otkrivanja bolesti, dijagnostičkoj obradi kongenitalne CMV infekcije i CMV-bolesti u HIV-om zaraženih osoba (26). Longitudinalno praćenje CMV viremije omogućuje praćenje učinka antivirusnog liječenja i moguće rezidualne virusne replikacije koja predstavlja i indirektan pokazatelj moguće rezistencije na ganciklovir. CMV DNA kvantificira se kvantitativnim PCR testovima najčešće u plazmi, krvi i urinu.

U kliničkoj dijagnostici kvantifikacija CMV DNA temelji se isključivo na testovima s granicom detekcije koja je definirana temeljem kliničke značajnosti viremije (najčešće od 500-1000 kopija CMV DNA/ml) dok se testovi vrlo velike osjetljivosti (primjerice s granicom detekcije <10 kopija CMV DNA/ml) ne primjenjuju se u dijagnostici (37-38). Naime, klinička korisnost vrlo osjetljivih testova za kvantifikaciju CMV DNA je ograničena zbog mogućnosti detekcije latentnog virusa (38).

Primjerice, Halfon i sur. (2011.) su izradili algoritam prema kojem se viremija od 1130 kopija CMV DNA/ml primjenjuje kao kriterij za započinjanje pre-emptivnog antivirusnog liječenja nakon transplantacije hematopoetskih stanica (osjetljivost 71%, specifičnost 65%) (39). U bolesnika liječenih transplantacijom solidnih organa, većina kliničkih studija pokazuje da su klinički značajne viremije >2000 kopija CMV DNA/ml (39, 40).

Kvantifikacija CMV DNA u amniotskoj tekućini te plazmi majke važna je komponenta dijagnostičke obrade moguće primarne CMV infekcije majke i fetu-

sa a dijagnoza kongenitalne CMV infekcije temelji na kvantifikaciji CMV DNA u urinu unutar prva 2 tjedna od poroda (41-43). Brojni literaturni podatci pokazuju da u postavljanju retrospektivne dijagnoze kongenitalne CMV infekcije detekcija CMV DNA u Guthire karticama (dried blood spots, DBS) može biti iznimno korisna (44). Preduvjet rutinske primjene detekcije CMV DNA u DBS je standardizacija metode ekstrakcije biološkog uzorka s filter papira te prilagodba metodologije izolacije nukleinskih kiselina iz ovakvog uzorka.

U molekularnoj dijagnostici EBV infekcije također se koriste isključivo kvantitativni PCR testovi. Kvantifikacija EBV DNA najčešće se primjenjuje u dijagnostičkoj obradi transplantiranih bolesnika u svrhu ranog otkrivanja posttransplantacijske limfoproliferativne bolesti (posttransplant lymphoproliferative disorder, PTLTD) (45).

Longitudinalno praćenje EBV viremije u perifernoj krvi preporučuje se u visokorizičnih bolesnika liječenih transplantacijom (serološki negativni primatelji stanica ili organa serološki pozitivnih davatelja). Osim u transplantacijskoj medicini, kvantifikacija EBV DNA primjenjuje se za praćenje kinetike virusne replikacije odnosno rezidualne viremije u bolesnika s klinički težim oblicima infekcijske mononukleoze od kojih posebno treba izdvojiti bolesnike s hemofagocitnim sindromom (46-47).

Razvoj hemofagocitnog sindroma u sklopu infekcijske mononukleoze uzrokovane EBV-om najčešći je u osoba azijskog podrijetla no opisan je i u Europi (47). Kvantifikacija EBV DNA primjenjuje se i u dijagnostičkoj obradi kronične aktivne EBV infekcije, EBV encefalitisa i malignih bolesti (45, 48).

Poseban izazov u kvalitetnoj molekularnoj dijagnostici EBV infekcije važno je odabrati odgovarajući biološki uzorak (periferna krv, plazma, serum) te pri longitudinalnom praćenju uvijek koristiti identičan molekularni test (45).

Molekularna dijagnostika infekcije virusom humane imunodeficiencije tipa 1 (HIV-1), virusom hepatitisa C (HCV) i virusom hepatitisa B (HBV)

Molekularne metode koriste se za praćenje kinetike aktivne virusne replikacije, procjenu uspješnosti antivirusnog liječenja, dokazivanje rezistencije na antivirusne lijekove kao i za analizu molekularne heterogenosti HIV-a tipa 1, HBV-a i HCV-a. Molekularna dijagnostika HIV-infekcije sastoji se od nekoliko područja testiranja:

- kvantifikacija HIV-1 RNA u plazmi;
- određivanje rezistencije HIV-a na antivirusne lijekove (inhibitore reverzne transkriptaze, inhibitore proteaze i inhibitore integraze);
- određivanje tropizma virusa u svrhu identifikacije bolesnika koji se mogu liječiti inhibitorom CCR5 koreceptora;
- detekcija HLA-B*5701 u kontekstu preosjetljivosti na abakavir.

PCR testovi u stvarnom vremenu za kvantifikaciju vanstanične HIV-1 RNA u plazmi omogućuju dijagnosticiranje zaraze HIV-om u djece mlade od 18 mjeseci kod kojih se zbog perzistencije majčinskih protutijela ne koriste serološke metode detekcije protutijela specifičnih za HIV (49, 50). Sukladno preporukama ekspertnog panela iz SAD-a "Panel on Antiviral Therapy and Medical Management of HIV-infected Children", kvantifikacija HIV-1 RNA u djece HIV-om zaraženih majki preporučuje se u dobi od 14-21 dana, 1-2 mjeseca kao i nakon 4-6 mjeseci (49). Klinička osjetljivost kvantifikacije HIV-1 RNA raste s dobi od 25-40% u prvih nekoliko tjedana života pa do čak 90-100% u dobi od 2-3 mjeseca (51-54).

Dijagnoza zaraze HIV-om u djece obvezno se temelji na dva PCR testa iz dva zasebna biološka uzorka u kojima je dokazana virusna replikacija. Zaraza HIV-om može se definitivno isključiti temeljem najmanje dva PCR testa u kojima HIV-1 RNA nije detektirana (prvi test učinjen u dobi ≥ 1 mjeseca a drugi u dobi ≥ 4 mjeseca života) (49). Kinetika HIV-

1 RNA u plazmi perinatalno zaražene djece razlikuje se u odnosu na uobičajeni obrazac viremije u odraslih HIV-om zaraženih osoba i adolescenata. Prospektivna studija Shearer i sur (1997) pokazala je da nakon relativno male viremije pri rođenju (<10000 kopija HIV-1 RNA/ml), u dobi od 2 mjeseca dolazi do porasta viremija na vrijednosti koje su često veće od 100000 kopija HIV-1 RNA/ml (55). Za razliku od kinetike viremije u odraslih osoba, kontrola virusne replikacije u djece se teže uspostavlja te se visoke vrijednosti viremije mogu detektirati i nakon nekoliko godina što se povezuje s nepotpuno razvijenim imunološkim sustavom kao i s povećanjem broja stanica u kojima se HIV može replicirati tijekom somatskog rasta djeteta (56-57).

U djece s dokazanom HIV-infekcijom, kvantifikacija HIV-1 RNA preporučuje se neposredno nakon dijagnoze te kasnije u intervalima praćenja od 3-4 mjeseca (49). Standardizirani testovi za kvantifikaciju HIV-1 RNA dostupni na tržištu temelje se na tri tipa tehnologije: PCR (klasični i u stvarnom vremenu), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification test) i bDNA (branched chain nucleic acid probe assay) testovima. Molekularna heterogenost HIV-a iznimno je značajna u području kvantifikacije HIV-1 RNA. Naime, ranije verzije klasičnih PCR testova nisu adekvatno kvantificirale non-B subtipove HIV-a (primjerice subtip K i neke cirkularne rekombinantne forme virusa) dok je dio testova (npr. NASBA i bDNA testovi) validiran samo za detekciju subtipova A-G iz grupe M. Kliničku značajnost neadekvatne detekcije/kvantifikacije non-B subtipova HIV-A pokazuje i primjer HIV-1 DNA testova kojima su dobiveni lažno-negativni rezultati u djece zaražene non-B subtipovima HIV-a (58-62).

U Europi, kvantifikacija HIV-1 RNA najčešće se temelji na novim generacijama PCR testovima u stvarnom vremenu koji su validirani za detekciju i ekvivalentnu kvantifikaciju svih subtipova iz grupe M kao i za izolate iz grupa O i N HIV-a (63). Analiza molekularne heterogenosti HIV-a u Hrvatskoj pokazala je značajnu zastupljenost non-B genotipova te brojne cirkularne rekombinantne forme što potvrđuje važnost primjene

najsuvremeniji PCR testova u stvarnom vremenu u rutinskoj dijagnostici (64).

Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u djece preporučuje se prije započinjanja liječenja (primarna rezistencija) kao i u djece s virusološkim neuspjehom terapije (65). Za određivanje rezistencije HIV-a na lijekove u rutinskoj dijagnostici preporučuje se primjena standardiziranih genotipizacijskih testova koji se temelje na sekvenciranju regija genoma koji kodiraju sintezu reverzne transkriptaze, proteaze i integraze. Klinička značajnost mutacija za rezistenciju procjenjuje se primjenom algoritma The International AIDS Society-USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group iz 2010. g. (65).

U dijagnostičkoj obradi osoba s akutnim ili kroničnim hepatitisom C molekularne metode primjenjuju se za kvantifikaciju HCV RNA u serumu prije i tijekom liječenja kao i za genotipizaciju virusa (66-68). Metoda izbora za dokazivanje aktivne virusne replikacije HCV-a je PCR u stvarnom vremenu zbog vrlo viske osjetljivosti (5-10 IU/ml seruma) i linearnog raspona detekcije od čak 8 log₁₀ IU/ml. Druge metode za kvantifikaciju/detekciju HCV RNA poput klasičnog PCR-a ili hibridizacijskih metoda rjeđe se koriste uglavnom zbog niže osjetljivosti (66-68).

Obzirom na značajnost genotipa kao prediktora ishoda liječenja pegiliranim interferonom alfa i ribavirinom, genotipizacija virusa obvezni je dio preterapijske obrade bolesnika s kroničnim hepatitisom C (67). Genotip HCV-a najčešće se određuje standardiziranim testovima koji se temelje na kombinaciji PCR-a i reverzne hibridizacije na nitroceluloznim membranama s probama koje su specifične za sekvence u 5' nekodirajućoj regiji genoma ili metodom sekvenciranja pojedinih regija genoma virusa (66, 69).

Kvantifikacija HBV DNA u serumu zaraženih osoba omogućava procjenu kinetike virusne replikacije koja je značajna za praćenje tijeka bolesti ali i za praćenje učinka antivirusnog liječenja te ranog otkrivanja mogućeg nastanka rezistencije na lijekove (66, 70, 71). Metoda izbora za kvantifikaciju HBV DNA u

kliničkim laboratorijima je PCR u stvarnom vremenu zbog iznimne osjetljivosti (donja granica detekcije 5-10 IU/ml) i linearnog raspona detekcije od čak 9 log₁₀ IU/ml.

Uz kvantifikaciju HBV DNA, molekularnim metodama određuje se rezistencija virusa na antivirusne lijekove te genotip virusa (72-76). Rezistencija HBV-a na analoge nukleozida i nukleotida može se odrediti ili standardiziranim testovima koji uključuju kombinaciju PCR-a i reverzne hibridizacije ili sekvenciranjem pol regije genoma virusa te analizom kliničke značajnosti otkrivenih mutacija (76). U bolesnika liječenih lamivudinom najčešće se nalaze mutacije rtM204V i rtM204I koje uzrokuju rezistenciju virusa na lamivudin i telbivudin (76).

LITERATURA

1. Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* 2007; 9: 21-39.
2. Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 731-42.
3. Muldrew KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 102-11.
4. Josko D. Molecular diagnostics in the public health laboratories *Clin Lab Sci* 2010; 23: 242-7.
5. Tunkel AR, Glaser CA, Bloch KC, Sejvar JJ, Marra CM, Roos KL, Hartman BJ, Kaplan SL, Scheld WM, Whitley RJ; Infectious Diseases Society of America. The management of encephalitis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 303-27.
6. Josko D. Molecular virology in the clinical laboratory. *Clin Lab Sci* 2010; 23: 231-6.
7. Seme K, Mocilnik T, Komlos KF, Doplihar A, Persing DH, Poljak M. GeneXpert enterovirus assay: one-year experience in a routine laboratory setting and evaluation on three proficiency panels. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1510-3.
8. Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* 2004; 11: 57-64.
9. Kimberlin D. Herpes simplex virus, meningitis and encephalitis in neonates. *Herpes* 2004; 11: 65-76.
10. De Tieghe X, Heron B, Lebon P et al. Limits of early diagnosis of herpes simplex encephalitis in children: a retrospective study of 38 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1335-9.

11. Weil AA, Glaser CA, Amad Z, Forghani B. Patients with suspected herpes simplex encephalitis: rethinking an initial negative polymerase chain reaction result. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1154-7.
12. Elbers JM, Bitnun A, Richardson SE, et al. A 12-year prospective study of childhood herpes simplex encephalitis: is there a broader spectrum of disease? *Pediatrics* 2007; 119: 399-407.
13. Mejias A, Bustos R, Ardura MI, Ramirez C, Sanchez PJ. Persistence of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of neonates with herpes simplex virus encephalitis. *J Perinatol* 2009; 29: 290-6.
14. Tang YW, Hibbs JR, Tau KR, Qian Q, Skarhush HA, Smith TF, Persing DH. Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 803-6.
15. Mussap M, Molinari MP, Senno E, Gritti P, Soro B, Mannelli S, Fabris C. New diagnostic tools for neonatal sepsis: the role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *J Chemother* 2007; 19: 31-4.
16. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect.* 2009; 58: 346-51.
17. Lamoth F, Jatun K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti O. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3510-6.
18. Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, Vesin A, Maurin M, Pavese P, Ravanel N, Bulabois CE, Brion JP, Pelloux H, Timsit JF. Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. *J Infect* 2010; 61: 335-42.
19. Vince A, Lepej SZ, Barsić B, Dusek D, Mitrović Z, Serventi-Seiwerth R, Labar B. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 1306-7.
20. Wong S, Pabbaraju K, Lee BE, Fox JD. Enhanced viral etiological diagnosis of respiratory system infection outbreaks by use of a multi-target nucleic acid amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 3839-45.
21. Merante F, Yaghoobian S, Janeczko R. Principles of the xTAG respiratory viral panel assay (RVP Assay). *J Clin Virol* 2007; 40: 31-5.
22. Papillard-Marchal S, Enouf V, Schnuriger A, Vabret A, Macheras E, Rameix-Welti MA, Page B, Freymuth F, van der Werf S, Garbarg-Chenon A, Chevallier B, Gaillard JL, Gault E. Monitoring epidemic viral respiratory infections using one-step real-time Triplex RT-PCR targeting influenza A and B viruses and respiratory syncytial virus. *J Med Virol* 2011; 83: 695-701.
23. Yang Y, Gonzalez R, Huang F, Wang W, Li Y, Vernet G, Wang J, Jin Q. Simultaneous typing and HA/NA subtyping of influenza A and B viruses including the pandemic influenza A/H1N1 2009 by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2010; 167: 37-44.
24. Lam WY, Leung TF, Lee N, Cheung JL, Yeung AC, Ho YI, Chan RC, Fung KS, Barr IG, Hui DS, Sung JJ, Chan PK. Development and comparison of molecular assays for the rapid detection of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus. *J Med Virol* 2010; 82: 675-83.
25. Kubo T, Agoh M, Maie Q, Fukushima K, Nishimura H, Yamaguchi A, Hirano M, Yoshikawa A, Hasebe F, Kohno S, Morita K. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 728-35.
26. Wenzel JJ, Panning M, Kaul KL, Mangold KA, Revell PA, Luna RA, Zepeda H, Perea L, Vazquez-Perez JA, Young S, Rodic-Polic B, Eickmann M, Drosten C, Jilg W, Reischl U. Analytical performance determination and clinical validation of the novel Roche RealTime Ready Influenza A/H1N1 Detection Set. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 3088-94.
27. Sambol AR, Iwen PC, Pieretti M, Basu S, Levi MH, Gilonske KD, Moses KD, Marola JL, Ramamoorthy P. Validation of the Cepheid Xpert Flu A real time RT-PCR detection panel for emergency use authorization. *J Clin Virol* 2010; 48: 234-8.
28. Roorda L, Buitenwerf J, Ossewaarde JM, van der Zee A. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant Bordetella species by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements. *BMC Res Notes* 2011; 4: 11.
29. Xu Y, Xu Y, Hou Q, Yang R, Zhang S. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. *APMIS* 2010; 118: 685-91.
30. Fry NK, Duncan J, Wagner K, Tzivra O, Doshi N, Litt DJ, Crowcroft N, Miller E, George RC, Harrison TG. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1023-9.
31. Caro V, Guiso N, Alberti C, Liguori S, Buruoa C, Couetdic G, Doucet-Populaire F, Ferroni A, Papin-Gibaud S, Grattard F, Réglie-Poupet H, Raymond J, Soler C, Bouchet S, Charreau S, Couzon B, Leymarie I, Tavares N, Choux M, Bingen E, Bonacorsi S. Proficiency program for real-time PCR diagnosis of Bordetella pertussis infections in French hospital laboratories and at the French National Reference Center for Whooping Cough and other Bordetelloses. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3197-203.
32. Sintchenko V. The re-emergence of pertussis: implications for diagnosis and surveillance. *N S W Public Health Bull.* 2008; 19: 143-5.
33. Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. Comparison of culture and PCR for detection of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol* 2004; 53: 749-54.
34. Holberg-Petersen M, Jenum PA, Mannsåker T, Melby KK. Comparison of PCR with culture applied on nasopharyngeal and throat swab specimens for the detection of Bordetella pertussis. *Scand J Infect Dis* 2011; 43: 221-4.
35. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, Caro V, Lorrot M, Carol A, Faye A, Guiso N, Bingen E, Bonacorsi S. Real-time PCR measurement of persistence of Bordetella pertussis DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3636-8.
36. El Amari EB, Combescure C, Yerly S, Calmy A, Kaiser L, Hasse B, Furrer H, Cavassini M, Vernazza P, Hirsch H, Bernasconi E, Hirschel B; for the Swiss HIV Cohort Study. Clinical relevance of cytomegalovirus viraemia. *HIV Med* 2011. 19. doi: 10.1111/j.1468-1293.2010.00900.x.
37. Kerschner H, Bauer C, Schlag P, Lee S, Goedel S, Popow-Kraupp T. Clinical evaluation of a fully automated CMV PCR assay. *J Clin Virol* (in press) 2011.
38. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, Allen U, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 779-95.
39. Halfon P, Berger P, Khiri H, Martineau A, Pénaranda G, Merlin M, Faucher C. Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol* 2011; 83 (3): 490-5.
40. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecová M, Klaboch J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 69-77.
41. Baquero-Artigao F; Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection. *An Pediatr (Barc).* 2009; 71: 535-47.
42. Yinon Y, Farine D, Yudin MH, Gagnon R, Hudon L, Basso M, Bos H, Delisle MF, Mentecoglou S, Mundle W, Ouellet A, Pressey T, Roggensack A, Boucher M, Castillo E, Gruslin A, Money DM, Murphy K, Ogilvie G, Paquet C, Van Eyk N, van Schalkwyk J; Fetal Medicine Committee, Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2010; 32: 348-54.
43. Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods* 2005; 128: 1-5.
44. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-Fenoel V, Guillemot T, Grangeot-Keros L, Ville Y, Grabar S, Magny JF. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 575-81.
45. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 2008; 18: 305-19.
46. Kozic S, Vince A, Bes JI, Rode OD, Lepej SZ, Poljak M, Bozic M, Kessler HH. Evaluation of a commercial real-time PCR assay for quantitation of Epstein-Barr virus DNA in different groups of patients. *J Virol Methods* 2006; 135: 263-8.
47. Vince A, Lepej SZ, Kurelac I, Barsic B, Kozic S, Klinar I, Zarkovic K. Virological and immunological characteristics of fatal Epstein-Barr virus mononucleosis in a 17-year-old Caucasian male presenting with meningoencephalitis and hemophagocytic syndrome. *J Neurovirol* 2007; 13: 389-96.
48. Doja A, Bitnun A, Ford Jones EL, Richardson S, Tellier R, Petric M, Heurter H, MacGregor D. Pediatric Epstein-Barr virus-associated encephalitis: 10-year review. *J Child Neurol* 2006; 21: 384-91.
49. Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-infected Children. Guidelines on the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. August 16, 2010; pp1-219. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/PediatricGuidelines.pdf>. Accessed (20.02.2011).
50. Sohn AH, Thanh TC, Thinh le Q, Khanh TH, Thu HK, Giang le T, Lien TX. Failure of human immunodeficiency virus enzyme immunoassay to rule out infection among polymerase chain reaction-negative Vietnamese infants at 12 months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 273-6.
51. Havens PL, Mofenson LM. Evaluation and management of the infant exposed to HIV-1 in the United States. *Pediatrics* 2009; 123: 175-87.
52. American Academy of Pediatrics Committee on Pediatric AIDS. HIV testing and prophylaxis to prevent mother-to-child transmission in the United States. *Pediatrics* 2008; 122: 1127-34.
53. Lambert JS, Harris DR, Stiehm ER, Moyer J Jr, Fowler MG, Meyer WA 3rd, Bethel J, Mofenson LM. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34: 512-125.
54. Nesheim S, Palumbo P, Sullivan K, Lee K, Vink P, Abrams E, Bulterys M. Quantitative RNA testing for diagnosis of HIV-infected infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 32: 192-5.
55. Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, Rich K, Handelsman E, Diaz C, Pagano M, Smeriglio V, Kalish LA. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1337-42.
56. Brams EJ, Weedon J, Steketee RW, Lambert G, Bamji M, Brown T, Kalish ML, Schoenbaum EE, Thomas PA, Thea DM. Association of human immunodeficiency virus (HIV) load early in life with disease progression among HIV-infected infants. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *J Infect Dis* 1998; 178: 101-8.
57. Krogstad P, Uittenbogaart CH, Dickover R, Bryson YJ, Plaeger S, Garfinkel A. Primary HIV infection of infants: the effects of somatic growth on lymphocyte and virus dynamics. *Clin Immunol* 1999; 92: 25-33.
58. Haas J, Geiss M, Bohler T. False-negative polymerase chain reaction-based diagnosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in children infected with HIV strains of African origin. *J Infect Dis* 1996; 174: 244-5.
59. Kline NE, Schwartzwald H, Kline MW. False negative DNA polymerase chain reaction in an infant with subtype C human immunodeficiency virus 1 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 885-6.
60. Obaro SK, Losikoff P, Harwel J, Pugatch D. Failure of serial human immunodeficiency virus type I DNA polymerase chain reaction to identify human immunodeficiency virus type I clade A/G. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 183-4.
61. Zaman MM, Recco RA, Haag R. Infection with non-B subtype HIV type 1 complicates management of established infection in adult patients and diagnosis of infection in newborn infants. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 417-8.
62. Geelen S, Lange J, Borleffts J, Wolfs T, Weersink A, Schuurman R. Failure to detect a non-B HIV-1 subtype by the HIV-1 Amplicor Monitor test, version 1.5; a case of unexpected vertical transmission. *AIDS* 2003; 17: 781-2.
63. Grgic I, Židovec Lepej S, Vince A, Begovac J. Increased frequency of viral loads above 100,000 HIV-1 RNA copies/ml measured by Roche Cobas TaqMan assay in comparison with Cobas Amplicor assay. *J Clin Virol* 2010; 48: 75-6.
64. Ramirez-Piedad MK, Lepej SZ, Yerly S, Begovac J. High prevalence of non-B HIV-1 subtypes in seamen and their sexual partners in Croatia. *J Med Virol* 2009; 81: 573-7.
65. Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med* 2010; 18: 156-63.
66. Židovec Lepej S, Dusek D, Budimir J, Vince A. (Molecular diagnosis of hepatitis C and hepatitis B infection) *Acta Med Croatica* 2009; 63: 361-9.
67. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA* 2007; 297: 724-32.
68. Zeuzem S, Poordad F. Pegylated-interferon plus ribavirin therapy in the treatment of CHC: individualization of treatment duration according to on-treatment virologic response. *Curr Med Res Opin* 2010; 26: 1733-43.
69. Vince A, Iščić-Beš J, Židovec Lepej S, Bača-Vrakela I, Bradarić N, Kurelac I, Vince DB. Distribution of hepatitis C genotypes in Croatia - a 10 year retrospective study of four geographic regions. *Coll Antropol* 2006; 30: 139-43.
70. Vivekanandan P, Singh OV. Molecular methods in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10: 921-35.
71. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antivir Ther* 2010; 3: 3-14.
72. Bhattacharya D, Thio CL. Review of hepatitis B therapeutics. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1201-8.
73. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 14-21.
74. Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007; 132: 1574-85.
75. Damerow H, Yuen L, Wiegand J, Walker C, Bock CT, Locarnini S, Tillmann HL. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern. *J Med Virol.* 2010; 82: 1850-8.
76. European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2009; 50: 227-42.

Summary

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

S. Židovec Lepej

Molecular methods are an essential part of clinical diagnostics in infectious diseases due to superior sensitivity, specificity and ability to provide results within clinically relevant time. The majority of molecular methods used in clinical laboratories are based on real-time polymerase chain reaction (PCR), nucleic acid hybridisation and sequencing. Molecular methods are widely used in infectious diseases for detection and/or quantification of microbial nucleic acids providing diagnosis, indirect measurement of replication rates, analysis of resistance to antimicrobial drugs as well as genotyping studies.

Descriptors: INFECTIOUS DISEASES, DIAGNOSTICS, PCR, HYBRIDISATION, SEQUENCING