

Serološka dijagnostika zaraznih bolesti

Đaković Rode, Oktavija

Educational content / Obrazovni sadržaj

Publication status / Verzija rada: **Accepted version / Završna verzija rukopisa prihvaćena za objavljivanje (postprint)**

Publication year / Godina izdavanja: **2022**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:619224>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)



Oktavija Đaković Rode

Serološka dijagnostika zaraznih bolesti

Nastavni tekst za studente Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2022.

Autor

Doc.dr.sc. Oktavija Đaković Rode, Katedra za kliničku mikrobiologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Kao autorica ovog nastavnog teksta jamčim da se radi o originalnom i vlastitom autorskom djelu, koje je u potpunosti samostalno napisano, te da su dijelovi preuzeti iz drugih izvora jasno i nedvojbeno citiranjem naznačeni kao tuđa autorska djela. Isto tako jamčim da su navedene ilustracije originalne i predstavljaju moje autorsko djelo, te da nema drugih osoba koje bi na njih polagale autorska prava.

Lektorica

Ivanka Vranković, prof.

Nastavni tekst pod naslovom „Serološka dijagnostika zaraznih bolesti“, autorice doc.dr.sc. Oktavije Đaković Rode pozitivno je ocijenjen 14. lipnja 2022. godine od strane Povjerenstva za vrednovanje nastavnog teksta u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Arjana Tambić Andrašević, izvanredna profesorica Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. izv.prof.dr.sc. Dragan Lepur, izvanredni profesor Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
3. prof.dr.sc. Dalibor Vukelić, redoviti profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

i kao takav ispunjava uvjete da postane nastavni materijal te se objavljuje na mrežnim stranicama Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za potrebe nastave iz predmeta Klinička mikrobiologija.

Sadržaj

	Stranica
Serološka dijagnostika zaraznih bolesti	5
1. Izravna i neizravna mikrobiološka dijagnostika	5
1.1 Izravna dijagnostika	6
1.2 Neizravna dijagnostika – serologija	7
2. Protutijela i antigeni	7
3. Imunosni odgovor	8
4. Uzorci za serološku dijagnostiku	9
5. Akutni i parni serum	11
6. Avidnost protutijela	12
7. Protutijela u likvoru	13
8. Konatalne infekcije	14
9. Serološki testovi	14
10. Metode u serološkoj dijagnostici	15
10.1 Imunoenzimski test	16
10.2 Imunofluorescentni test	17
10.3 Reakcija vezanja komplementa	17
10.4 Aglutinacijski testovi	18
10.5 Imunokromatografski test	19
10.6 Imunoblot test / western blot	19
11. Interpretacija rezultata seroloških pretraga	20
11.1 Vrijeme oduzimanja uzorka	21
11.2 Lažno pozitivni i lažno negativni rezultati	22
Literatura	25

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA ZARAZNIH BOLESTI

Zarazne bolesti uzrokuju mnogobrojni mikroorganizmi – bakterije, virusi, paraziti, gljive. Klinička slika najčešće nije patognomična. Različiti uzročnici mogu uzrokovati iste ili slične simptome. Utvrđivanjem simptoma bolesti, u skladu s anamnestičkim i epidemiološkim podacima, započinje diferencijalno dijagnostički postupak otkrivanja uzroka bolesti i potom slijedi prikupljanje uzoraka za mikrobiološku obradu.

Mikrobiološka dijagnostika obuhvaća različite postupke i metode koji se kombiniraju, nadopunjuju i interpretiraju ovisno o pretpostavljenoj dijagnozi, patogenezi, duljini trajanja bolesti te primijenjenoj terapiji. Cilj je utvrditi etiologiju bolesti najboljim odabirom testova što će omogućiti optimalno liječenje (1,2).

1. IZRAVNA I NEIZRAVNA MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA

Mikrobiološki postupci za utvrđivanje etiologije bolesti dijele se na izravne i neizravne. Izravna dijagnostika su:

- a) postupci izdvajanja i kultiviranja uzročnika u odgovarajućim uvjetima,
- b) dokazivanje genoma metodama molekularne dijagnostike,
- c) određivanje specifičnih antigena pomoću imunotestova.

Neizravnim dijagnostičkim postupcima određujemo imunosni odgovor bolesnika i prati se stvaranje specifičnih protutijela nakon kontakta sa stranim agensom. Neizravni dijagnostički postupci predstavljaju serološku dijagnostiku. Svaku pretragu potrebno je interpretirati u skladu s kliničkim, anamnestičkim i epidemiološkim podacima (1-9).

1.1. Izravna dijagnostika

Primarni cilj mikrobiološke dijagnostike je izravno dokazati uzročnika. Uzročnici se mogu dokazivati iz različitih kliničkih materijala kao što su urin, stolica, biopati, aspirati, sputum, krv, likvor te obrisci ždrijela, nazofarinksa, nosa, kože. Standardna mikrobiološka dijagnostika obično započinje mikroskopiranjem preparata kliničkog materijala svjetlosnim mikroskopom i traženjem tipičnih oblika bakterija, gljiva i parazita. Preparati se mogu gledati nativno bez bojenja, a u bakteriologiji je osnovno bojenje po Gramu. Virusni se zbog svoje veličine ne mogu vidjeti svjetlosnim mikroskopom, ali se mogu vidjeti promjene koje uzrokuju na stanicama u kojima se repliciraju. Promjene na stanicama koje nastaju djelovanjem virusa nazivaju se citopatski učinak. Prema izgledu citopatskog učinka može se postaviti preliminarna dijagnoza virusne bolesti koju je potrebno specificirati virološkim testovima (2,4).

Metode molekularne dijagnostike, kao što su hibridizacija i amplifikacija nukleinskih kiselina (NAAT, *nucleic acid amplification test*; PCR, *polymerase chain reaction*), izvode se iz istih uzoraka kao standardna mikrobiološka dijagnostika. Prednosti molekularne dijagnostike su brzina dobivanja rezultata i mogućnost dokazivanja vrlo malih količina uzročnika, kao i onih koji se ne mogu jednostavno i brzo uzgojiti u laboratorijskim uvjetima. Nedostatci molekularnih metoda mogući su lažno pozitivni rezultati zbog kontaminacije, ali i lažno negativni rezultati zbog inhibicije. Molekularnom dijagnostikom nije moguće razlikovati žive od neživih patogena, i nije moguće definirati osjetljivost na lijekove (8).

U izravne dijagnostičke metode spadaju i testovi za dokazivanje antigena koji se temelje na reakciji vezivanja između antigenskih komponenti patogena i obilježenih specifičnih protutijela. Metode za određivanje antigena često se zbog jednostavnosti izvođenja koriste za brzo, pa i izvanlaboratorijsko određivanje uzročnika bolesti (5,10-12).

Kad god je moguće, uzročnika bolesti treba izdvojiti i umnožiti kako bi se odredila osjetljivost na lijekove i napravila tipizacija za epidemiološko praćenje. Dokazivanje, pak, samog uzročnika nije uvijek moguće. Kultivacija uzročnika može biti neuspješna zbog ranog uvođenja antibiotika, prekasnog uzimanja uzorka nakon početka bolesti, premale količine uzorka ili uzročnika, ili zbog neadekvatnog transporta i čuvanja uzorka. Neke vrste virusa i bakterija se *in vitro* ne mogu uzgojiti ili je izdvajanje dugotrajno i zahtjevno pa nije primjenjivo u svakodnevnom radu. Virusni se umnožavaju samo u živim stanicama, a njihova izolacija može

izostati ako se koriste neadekvatne stanice bilo u staničnim kulturama, embrioniranim jajima ili pokusnim životinjama. Postupak s uzorkom nakon uzimanja i tijekom transporta do laboratorija ključan je za uspješan rezultat obrade. Izdvajanje virusa može se izvoditi samo u specijaliziranim ustanovama što predstavlja ograničenje za rutinsku praksu (1-4).

1.2. Neizravna dijagnostika – serologija

Zarazne bolesti mogu se dokazati i određivanjem specifičnih protutijela u krvi bolesnika. Protutijela nastaju kao odgovor limfocita B na poticaj antigena. Testovi koji se temelje na vezanju antigena i protutijela, čine serološku dijagnostiku. Serološki testovi za određivanje protutijela koriste se za neizravno dijagnosticiranje zaraznih bolesti te za istraživanje prevalencije i potrebe za cijepljenjem.

Za optimalni odabir mikrobiološke metode potrebno je poznavati status bolesnika, kliničku sliku, anamnestičke i epidemiološke podatke. Kliničar i mikrobiolog u timskom radu diferencijalno dijagnostički usmjeravaju obradu (1,5,10,11-16).

2. PROTUTIJELA I ANTIGENI

Protutijela ili antitijela (At) su glikoproteinske molekule, tj. imunoglobulini (Ig) koje proizvode limfociti B kao rezultat imunskog odgovora na nepoznatog uzročnika, tj. na antigen (Ag). Antigeni su dijelovi mikroorganizama, npr. proteini, polisaharidi, glikoproteini, enzimi, lipidi te druge neproteinske molekule koje potiču imunski sustav na stvaranje protutijela. Protutijela se za antigen vežu specifično i s visokim afinitetom te pomažu domaćinu da ih ukloni. U serologiji se prate značajke humoralnog imunskog odgovora. Određivati se mogu specifična protutijela razreda IgM, IgG, IgA (rjeđe IgE) ili ukupna specifična protutijela (3).

Tablica 1. Osnovne značajke imunoglobulina

IMUNOGLOBULIN	GLAVNA ULOGA
IgM	Primarni odgovor na antigen; veže komplement; receptor je antigena na limfocitima B; ne prolazi kroz placentu
IgG	Opsonizacija bakterija - olakšava fagocitozu; veže komplement; neutralizira bakterijske toksine i viruse; prolazi kroz placentu
IgA	Sekretorna protutijela - sprječavaju prihvaćanje bakterija i virusa za mukozne membrane; ne vežu komplement
IgE	Sudjeluju u reakcijama rane preosjetljivosti; nakon izlaganja alergenima uzrokuju oslobađanje medijatora iz mastocita i bazofila

3. IMUNOSNI ODGOVOR

Nakon susreta s nepoznatim antigenom imunosni sustav reagira stvaranjem protutijela. To se naziva - primarna reakcija ili **primarni imunosni odgovor**. Prvo se pojavljuju protutijela razreda IgM. Protutijela obično postaju mjerljiva 7-10 dana nakon infekcije, ovisno o prirodi i količini antigena te mjestu ulaska u organizam. Stvara se klon limfocita B te plazma-stanica specifičnih za antigen. Serumska protutijela obično rastu nekoliko tjedana, a zatim postupno padaju. Imunoglobulini G (IgG) javljaju se nešto kasnije od IgM, također postupno rastu i traju dulje od IgM. Protutijela IgG mogu ostati prisutna doživotno. Nakon pojave IgG protutijela IgM padaju i s vremenom postupno nestaju. Protutijela IgG ukazuju na raniju izloženost antigenu, odnosno potvrđuju stečeni imunitet nakon preboljele bolesti ili cijepljenja i predstavljaju anamnestički odgovor.

Sekundarni imunosni odgovor razvija se nakon **reinfekcije**, tj. ponovnog susreta s poznatim antigenom mjesec ili godine nakon primarne infekcije ili nakon cijepljenja. Sekundarni imunosni odgovor značajno je brži i temelji se na protutijelima IgG. Specifična protutijela proizvedu se obično nakon 3-5 dana i dosežu više razine nego u primarnoj infekciji

zahvaljujući memorijskim stanicama koje su ostale nakon primarnog kontakta. U reinfekciji specifični IgM često poraste slabo, tako da ne mora biti mjerljiv, a dijagnoza se postavlja prema dinamici protutijela IgG koja se stvaraju brzo i u većoj količini.

Latentni uzročnici kao što su npr. herpesvirusi ili toksoplazma, mogu se u određenim okolnostima reaktivirati i ponovno uzrokovati bolest. U **reaktivaciji** također dolazi do brzog porasta količine IgG, a u značajnoj količini mogu se razviti sekretorna protutijela IgA koja dodatno potvrđuju akutnu infekciju. U reaktivaciji kao i u reinfekciji protutijela IgM prisutna su obično kratkotrajno i u niskoj razini, a često se i ne mogu detektirati.

Imunosni odgovor i zaštitna količina stvorenih protutijela individualni su što otežava standardizaciju rezultata seroloških testova. Imunost ovisi o dobi. Slabiji imunski odgovor uočava se u novorođenačkoj i starijoj životnoj dobi. U starijoj životnoj dobi imunost općenito slabi, reducira se odgovor IgG i infekcije postaju teže. Novorođenčad, čiji se imunski sustav tek razvija, nakon porođaja štite prenesena majčina protutijela IgG. Majčina protutijela se postupno gube i obično su nemjerljiva šest mjeseci nakon rođenja - iako se ponekad mogu naći i kasnije. Kolostrum sadrži sekretorna protutijela IgA koja štite novorođenče od respiratornih i gastrointestinalnih infekcija. Na strane antigene novorođenčad stvara vlastita protutijela IgM, a zatim i IgG.

Pri procjeni imunskog odgovora nakon infekcije posebnu pozornost treba posvetiti imunokompromitiranim osobama koje imaju oslabljeni imunitet. Na nalaz može utjecati i pasivni prijenos IgG putem transfuzija krvi i krvnih produkata, kao i vertikalni prijenos IgG s majke na novorođenče tijekom trudnoće, porođaja te dojenjem (3,5-7).

4. UZORCI ZA SEROLOŠKU DIJAGNOSTIKU

Osnovni uzorak za serološku dijagnostiku je serum. Serum je tekući dio krvi koji ostaje nakon odvajanja stanica. Uzorak pune krvi dobije se punkcijom vene u aseptičkim uvjetima. U sterilnu epruvetu bez antikoagulansa uzme se 5-10 ml krvi. Krv se ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi da se počne stvarati koagulum, nakon čega se centrifugira. Krv se ne smije centrifugirati neposredno nakon vađenja jer dolazi do hemolize. Nakon centrifugiranja bistri supernatant, tj. serum, izdvoji se u sterilnim uvjetima u plastičnu transportnu epruvetu.

Epruveta s uzorkom mora biti označena podacima o pacijentu i vremenu uzimanja krvi. Svi postupci rukovanja s uzorcima moraju se uvijek obavljati uz zaštitne mjere koje se primjenjuju pri kontaktu s krvi i drugim tjelesnim tekućinama jednako za sve pacijente, bez obzira na uputnu dijagnozu.

Do testiranja serum se može čuvati 7-10 dana u hladnjaku na temperaturi od +2-8°C. Za dulje čuvanje serum se pohranjuje u ledenici na temperaturi od -20°C ili nižoj, i takav se može čuvati mjesecima pa i godinama. Nikada se ne smije zamrznuti uzorak pune krvi jer će doći do hemolize te takav uzorak postaje neuporabiv za serološku analizu. Učestalo višekratno zamrzavanje i odmrzavanje seruma također može dati pogrešne rezultate. Stoga za dugotrajno čuvanje serum je poželjno alikvotirati, tj. razdijeliti u više manjih epruveta. Hemolizirani, lipemični ili kontaminirani serumi nisu pogodni za serologiju. Kvaliteta seruma utječe na rezultate testiranja.

Protutijela se mogu određivati i u likvoru, rjeđe u očnoj vodici te u oralnoj tekućini. Za interpretaciju značenja nalaza u likvoru potrebno je definirati izvor nastanka protutijela. Posebno dizajniranim testovima moguće je testirati protutijela i iz oralne tekućine koja se dobije obriskom gingive uz gingivalne džepove u kojima završavaju kapilare iz kojih secerniraju plazma-stanice koje proizvode specifična protutijela. Oralna tekućina za serološku dijagnostiku razlikuje se od sline jer je koncentracija imunoglobulina koji se mogu detektirati veća, za razliku od sline u kojoj su zanemarive količine specifičnih protutijela.

Serološka dijagnostika načelno se radi u većim laboratorijskim centrima pa se uzorci često moraju transportirati. Transport uzoraka mora biti u zaštićenim čvrstim posudama kako ne bi došlo do razlijevanja materijala i širenja infekcije. Sa svakim uzorkom mora se postupati jednako kao da je potencijalno infektivan. Uzorak se pakira u tri zaštitna spremnika: primarni u kojem se nalazi uzorak; sekundarni, čvrsti plastični ili drveni te kartonski ili papirnati omotač na koji se zabilježi adresa. Prije stavljanja u plastičnu ili drvenu kutiju primarni spremnik odnosno epruveta s uzorkom mora se dobro zatvoriti i obložiti upijajućim materijalom (staničevinom), kako u slučaju mogućeg oštećenja (razbijanje, otvaranje čepa) sadržaj ne bi iscurio u okolinu. Na dno i na vrh sekundarnog spremnika stavlja se upijajući materijal. Uz svaki uzorak mora biti priložena uputnica na kojoj su navedeni podaci o bolesniku koji moraju biti jednaki kao podaci zabilježeni na epruveti. Osim podataka o pacijentu na uputnici treba biti naveden datum vađenja krvi, uputna dijagnoza, vrijeme početka bolesti, terapija i tražene

laboratorijske pretrage. Uputnica ne smije doći u izravan kontakt s primarnim spremnikom, već se stavlja izvan sekundarnog spremnika.

5. AKUTNI I PARNI SERUM

Serološka dijagnostika temelji se na praćenju dinamike protutijela. Za dokazivanje akutne infekcije uspoređuje se razina protutijela u dva ili više seruma koji su uzeti u vremenskim razmacima. Takve serume nazivamo **parni serumi**. Količina protutijela određuje se u prvom serumu na početku bolesti, što ranije, odnosno neposredno nakon što se bolesnik javlja liječniku, te u drugom obično 2-3 tjedna kasnije. Serum uzet na početku bolesti naziva se **prvi ili akutni**, a drugi je **parni ili rekonvalescentni serum**. Neki uzročnici kao što su, primjerice, uzročnici atipičnih pneumonija, borelije, anaplazma ili HIV, mogu imati usporeno stvaranje specifičnih protutijela pa je novi serum potrebno uzeti i nakon 4-9 tjedana.

Novostvorena protutijela u akutnom serumu koji je uzet prvih dana bolesti, mogu biti nemjerljiva. Obvezno je testirati parni serum u kojem će se dokazati serokonverzija, tj. novonastala specifična protutijela čime se potvrđuje primarna infekcija. Akutnu infekciju može se dokazati i nalazom značajnog porasta količine protutijela u parnim serumima. Da bi se značenje rezultata testiranja parnih seruma moglo interpretirati, uzorci seruma moraju se ispitivati istovremeno u istim laboratorijskim uvjetima. Količina protutijela može se mjeriti i izražava se kao **titar** ili u drugim jedinicama ovisno o metodi testiranja. Referentne vrijednosti serološkog testa prema kojima definiramo što je pozitivan nalaz, moraju biti navedene uz rezultat.

Titar predstavlja količinu ili razinu protutijela. Isti pojam koristi se kao mjera kvantitativnog izražavanja testa u kojem se razina protutijela definira kao recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja seruma koje daje pozitivan rezultat. Primjeri testova koji se kvantitativno izražavaju u titru su reakcija vezanja komplementa (RVK), imunofluorescencija (IFA) i aglutinacija. U njima treba serum serijski dvostruko razrijediti i testirati svako razrjeđenje sve dok reakcija ne bude negativna. Na primjer, titar od 40 znači da u ispitivanoj reakciji serum pokazuje učinak kada se razrjeđuje 1:40, dok je u razrjeđenju 1:80 negativan. Titar je mjera količine protutijela u jedinici volumena originalnog seruma. Ako je rezultat prvog seruma pozitivan, za dokaz akutne infekcije potrebno je dokazati najmanje četverostruki porast titra

protutijela u parnom serumu. Ako je titar prvog seruma npr. 10, titar parnog seruma mora biti najmanje 40 ili viši da bismo indirektno dokazali akutnu infekciju.

Ako se bolesnik javio kasno nakon početka bolesti, titar protutijela može biti visok i u parnom serumu bez značajne promjene što može biti vrhunac stvorenih protutijela (npr. titar u prvom uzorku 256, a u drugom 512 i ne zadovoljava kriterij četverostruke razlike). Za dokaz infekcije treba tada uzeti treći serum da dokažemo pad titra protutijela u rekonvalescentnoj fazi bolesti (npr. titar u trećem serumu 64).

Serumi se mogu testirati odmah nakon uzimanja ili se prvi uzorak sačuva i pošalje u laboratorij zajedno s parnim serumom. Ako se prvi serum testira neposredno nakon uzimanja, i parni serum treba testirati u istom laboratoriju da možemo usporediti i interpretirati rezultate analize.

Određivanje specifičnih protutijela osim za dokazivanje akutne bolesti, koristimo za definiranje imunosnog statusa prije i nakon cijepljenja. Tada je dovoljno testirati jedan serum za IgG protutijela.

6. AVIDNOST PROTUTIJELA

Avidnost predstavlja jačinu vezanja protutijela za antigen. Testovi avidnosti dodatno se koriste za procjenu akutnosti infekcije. Kako se razvija imunosni odgovor, avidnost protutijela raste. U početku infekcije, tijekom akutne faze bolesti, protutijela IgG se slabo vežu za antigen, tj. imaju nisku avidnost. Jačina vezanja IgG za antigen se povećava s napredovanjem infekcije i protutijela se teže disociraju od antigena. Protutijela niske avidnosti mogu perzistirati najmanje 3 do 5 mjeseci, tako da neposrednu infekciju nije moguće potvrditi. Promjena niske avidnosti u visoku događa se u većine pacijenata unutar 6 mjeseci. Visoka avidnost dokaz je infekcije koja traje od 3 do 5 mjeseci.

Test avidnosti temelji se na usporedbi količine vezanih protutijela IgG za antigen koja su određena standardnim imunoenzimnim postupkom i količine protutijela na čije vezanje za antigen se djelovalo reagensom koji raskida vezu između antigena i protutijela. Oba testiranja se rade istovremeno. Kad je avidnost visoka, vezanje protutijela i antigena u oba testiranja je približno jednako jer reagens nije raskinuo čvrstu vezu IgG i antigena. U ranoj infekciji

protutijela se slabo vežu za antigen, veza se lako raskine te je odnos količine vezanih i nevezanih protutijela nizak.

Visoka avidnost smatra se pokazateljem infekcije u prošlosti. Niska avidnost nije uvijek dokaz recentne infekcije jer je u nekih osoba porast avidnosti veoma spor. Kod takvih pacijenata u dijagnostici akutne bolesti može pomoći praćenje dinamike protutijela IgG.

7. PROTUTIJELA U LIKVORU

U zdravih osoba u likvoru nema specifičnih protutijela ili ih ima veoma malo. U infekcijama središnjeg živčanog sustava, meningitisu ili encefalitisu, protutijela se mogu proizvoditi lokalno iz limfocita u likvoru. Da bismo procijenili intratekalnu tvorbu protutijela, moramo istovremeno testirati uzete uzorke likvora i seruma u jednom laboratoriju metodom koja se izvodi u isto vrijeme na oba uzorka. Kod traumatske lumbalne punkcije protutijela iz krvi mogu prijeći u likvor i rezultat u likvoru može biti lažno pozitivan. Za procjenu porijekla nađenih protutijela u likvoru, treba provjeriti integritet krvno-moždane membrane i odrediti indeks likvorskih protutijela (*antibody index*; AI). Iz istovremeno uzetih likvora i seruma, uz specifična protutijela moraju se odrediti i tzv. „surogat“ protutijela ili ukupni imunoglobulini ili albumini. „Surogat“ protutijela su ubikvitarno prisutna protutijela u serumu zdravih osoba, koja nisu vezana uz akutnu bolest, a koja se normalno u likvoru ne nalaze (primjerice protutijela za adenoviruse). Za određivanje indeksa protutijela uspoređuje se omjer likvorskih i serumskih specifičnih protutijela na traženog uzročnika s omjerom likvorskih i serumskih protutijela na ubikvitarnog uzročnika ili likvorskih i serumskih ukupnih imunoglobulina ili albumina. Zdrave osobe imaju indeks likvorskih protutijela između 0,5 i 1,5. Vrijednost indeksa veća od 2 smatra se značajnim nalazom koji potvrđuje intratekalnu sintezu protutijela.

U bolestima u kojima dolazi do polispecifične intratekalne sinteze imunoglobulina (plazmocitom, kronične infektivne bolesti), indeks likvorskih protutijela može se procijeniti pomoću Reiberove formule. Reiberova formula predstavlja matematički model u kojem se indeks procjenjuje pomoću definirane vrijednosti albumina iz istih uzoraka iz kojih se određuju specifična protutijela za traženog uzročnika.

8. KONATALNE INFEKCIJE

U konatalnim infekcijama novorođenče stvara vlastita specifična protutijela, a istovremeno posjeduje pasivno prenesena protutijela IgG od majke. Za razlikovanje majčinih protutijela od protutijela novorođenčeta uspoređujemo i pratimo u mjesečnim intervalima specifična protutijela IgG majke i djeteta koja su testirana istom metodom u istom laboratoriju. Perzistenciju IgG u novorođenčeta dulje od godine dana bez značajnijeg pada titra smatramo indirektnom potvrdom konatalne infekcije. Konatalna infekcija ne može se definirati prema jednom serološkom nalazu.

Protutijela IgM ne prolaze placentu, ali pri oštećenju placente, odnosno pri samom porođaju, može doći do prijelaza IgM i IgA od majke na dijete. Za sigurnu potvrdu nalaza protutijela IgM i IgA u novorođenčeta treba nakon nekoliko dana testirati još jedan uzorak seruma djeteta. Poluvrijeme života protutijela IgM iznosi 3 do 5 dana. U konatalnoj infekciji prisutna su aktivno proizvedena protutijela u djeteta.

9. SEROLOŠKI TESTOVI

Serološki testovi koriste se u dijagnostici akutnih infekcija za utvrđivanje imunskog statusa te u epidemiološkim istraživanjima prevalencije bolesti u populaciji. Dobar serološki test mora imati visoku osjetljivost i specifičnost. Osjetljivost testa odnosi se na udio pojedinaca sa specifičnom bolesti koji imaju pozitivan rezultat testa. Negativne rezultate u tih osoba interpretiramo kao lažno negativne. Specifičnost testa odnosi se na udio osoba koje nisu bolesne i koje imaju negativan rezultat testa. Pozitivan test u ovih osoba interpretiramo kao lažno pozitivan. Osjetljivost i specifičnost testa ovise o korištenim antigenima. Testovi koji se temelje na rekombinantnim i sintetskim peptidnim antigenima općenito su specifičniji. Pri interpretaciji rezultata seroloških testova važno je poznavati i pozitivnu prediktivnu vrijednost testa koja je povezana s prevalencijom ispitivane bolesti u populaciji. Pozitivna prediktivna vrijednost predstavlja vjerojatnost bolesti u pacijenta koji ima pozitivni rezultat testiranja. Negativna prediktivna vrijednost predstavlja vjerojatnost da je osoba zdrava ako je rezultat negativan ili normalan. U populacijama s niskom prevalencijom ispitivane bolesti, testovi će imati nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost. Ako se koristi serološki test osjetljivosti primjerice 95% i

specifičnosti 90%, njegova pozitivna prediktivna vrijednost, tj. vjerojatnost da rezultat testa pokazuje stvarnu bolest, ovisit će o prevalenciji te bolesti na ispitivanom području. Tako će u područjima niske prevalencije, npr. od 1%, pozitivna prediktivna vrijednost biti niskih 8,8%, dok će negativna prediktivna vrijednost biti visokih 99,7%. U područjima gdje je prevalencije 10%, pozitivna prediktivna vrijednost s istim testom poraste na 51,4%, a negativna prediktivna vrijednost je i dalje visokih 99,4%. To znači da negativni rezultat seroloških testova s velikom sigurnošću isključuje bolest u područjima s niskom prevalencijom ispitivane bolesti. U ranoj fazi akutne bolesti, kad se imunosni odgovor još nije razvio, negativan serološki rezultat treba interpretirati oprezno (12-16).

10. METODE U SEROLOŠKOJ DIJAGNOSTICI

Reakcije između antigena i protutijela odvijaju se na molekularnoj razini i nisu vidljive. Da bismo mogli očitati rezultat vezanja antigena i protutijela, koristimo različite metode. Serološke metode primarno su namijenjene za određivanje protutijela u serumu. Po istom načelu iz kliničkih uzoraka, ovisno o kliničkoj slici, određivati se mogu antigeni pomoću poznatih protutijela (16).

Serološke metode mogu se koristiti u dvije svrhe:

- a) kao testovi za određivanje antigena pomoću poznatog protutijela,
- b) kao serološki testovi za određivanje protutijela pomoću poznatog antigena.

Povezani antigeni i protutijela (Ag-At) tvore kompleks koji se može vizualizirati različitim metodama koje ovise o vrsti antigena, vrsti reakcije i mediju na kojem se reakcija izvodi. Odabir metode ovisi o dijagnostičkim potrebama i mogućnostima laboratorija. Klasične serološke metode, kao što je reakcija vezanja komplementa (RVK), aglutinacija i precipitacija danas se rijetko koriste. Za obilježavanje kompleksa najčešće se koriste tzv. sekundarna protutijela - protutijela protiv humanih imunoglobulina koja su obilježena enzimom ili fluoresceinom i vežu se za kompleks Ag-At. Suvremena serološka dijagnostika su imunoenzimski (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*; CLIA, *chemiluminescent immunoassay*), imunofluorescentni (IFA), imunokromatografski (ICA) i imunoblot (IB; LIA, *line immunoblot*; WB, *western blot*) testovi. Neutralizacijski test je potvrdni test koji se radi za

utvrđivanje učinkovitosti detektiranih protutijela. Rezultat neutralizacijskog testa ovisi o sposobnosti protutijela da neutraliziraju infektivnost ispitivanog uzročnika i korelira s aktivnom zaštitom od ponovne infekcije. Za test neutralizacije potrebno je imati uzgojenog uzročnika.

Većina testova u serološkoj dijagnostici zaraznih bolesti nije standardizirana pa se kvantitativni rezultati interpretiraju prema nuputcima proizvođača koji definiraju jedinice kao i kategorizaciju za pozitivni, granični ili negativni nalaz. Rezultati se mogu izražavati kao titar, indeks (odnos izmjerene vrijednosti iz seruma i graničnog nalaza kontrolnog uzorka) ili različite arbitrarne jedinice (npr. U/mL, AU/mL, VE i sl.). Uz svaki serološki nalaz trebaju biti naznačene referentne vrijednosti pojedinog testa.

10.1 Imunoenzimski test

U imunoenzimskim testovima (EIA, enzyme immunoassay; ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*; CLIA, *chemiluminescent immunoassay*) detekcija kompleksa protutijela i antigena provodi se pomoću svjetlosnih (kemiluminiscencija) ili kolorimetrijskih signala. Signali su rezultat enzimske reakcije za kvalitativno ili kvantitativno određivanje protutijela ili antigena.

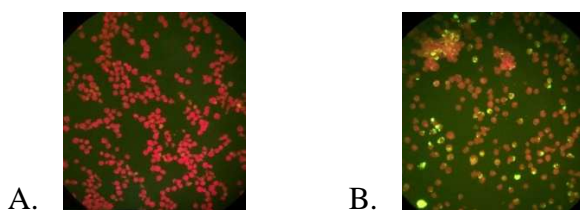
U testu ELISA antigeni su vezani na dno jažice u mikrotitarskoj ploči. Nakon dodavanja seruma specifična protutijela se vežu za antigen. Za vizualizaciju kompleksa Ag-At dodaje se sekundarno protutijelo (antihumani imunoglobulin) na koji je vezan enzim. U sljedećoj fazi dodaje se supstrat za enzim što će obojiti reakciju ako postoji kompleks Ag-At-enzim. Jačina boje mjeri se spektrofotometrijski i proporcionalna je količini protutijela. Jačina boje uspoređuje se s poznatim vrijednostima iz kontrolnih uzoraka i prema zadanim kriterijima se definira rezultat: kvalitativno (pozitivno, negativno, granično) ili kvantitativno kao količina protutijela u zadanim jedinicama. Budući da rezultat imunoenzimskog testa očitavamo prema intenzitetu boje ili signala, i ne testiramo dvostruka razrjeđenja seruma, akutnu infekciju dokazat ćemo prema najmanje dvostrukom porastu titra protutijela u parnom serumu.



Slika 1. Imunoenzimski test ELISA – jačina žute boje uspoređuje se s vrijednostima kontrola i definira se koncentracija i pozitivan rezultat; bezbojne jažice su negativan nalaz.

10.2. Imunofluorescentni test

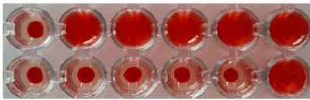

Indirektni imunofluorescentni test (IFA) radi se na predmetnom mikroskopskom staklu na kojem se nalazi antigen, a dodaje se serum pacijenta. Nakon inkubacije dodaje se sekundarno protutijelo na koje je vezana fluorescentna boja. Reakcija se gleda fluorescentnim mikroskopom. Za definiranje količine protutijela potrebno je u daljnjem testiranju napraviti dvostruka razrjeđenja seruma i testirati ih. Najveće razrjeđenje koje daje jasno pozitivan nalaz je titar ili količina protutijela. U IFA testu dokaz akutne infekcije je četverostruki porast titra protutijela.



Slika 2. Test indirektne imunofluorescencije – A. Negativno; B. Pozitivno; zelena fluorescentna boja na slici dokaz je prisutnosti protutijela u serumu

10.3. Reakcija vezanja komplementa

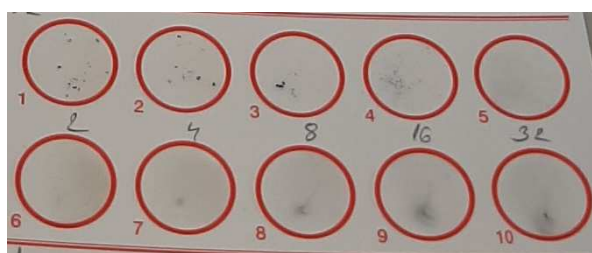
Reakcija vezanja komplementa (RVK) danas se rijetko koristi zbog ograničene osjetljivosti i specifičnosti. Dokazuju se protutijela koja u prisutnosti antigena vežu **komplement**. Kad se protutijelo kombinira s antigenom koji tvori dio površine određenih stanica (npr. neke vrste gram-negativnih bakterija ili virusa i eritrocita) uz prisutnost komplementa stanice se liziraju, što znači da su otopljene. Kao indikator prisutnosti protutijela koristi se hemolitički sustav (eritrociti ovna i hemolizin, tj. specifična protutijela za njih).

Serum razrjeđenje	Reakcija vezanja komplementa (RVK)	Titar	Interpretacija
S1 1:2 S2 1:2	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 </div> 	2 32	Akutna infekcija → značajan porast titra protutijela (>4x)
S1 1:2 S2 1:2		0 8	Akutna infekcija → serokonverzija

Slika 3. Reakcija vezanja komplementa u mikrotitarskoj ploči - Prvi i drugi red predstavljaju testiranje parnih seruma, akutnog i rekonvalescentnog, u dvostrukim serijskim razrjeđenjima. Titar protutijela je recipročna vrijednost najvećeg razrjeđenja koje daje pozitivnu reakciju (pozitivna reakcija su istaloženi eritrociti na dnu jažice). Rezultati se intepretiraju usporedbom titrova između parnih seruma i utvrđivanjem četverostruke razlike.

10.4 Aglutinacijski testovi

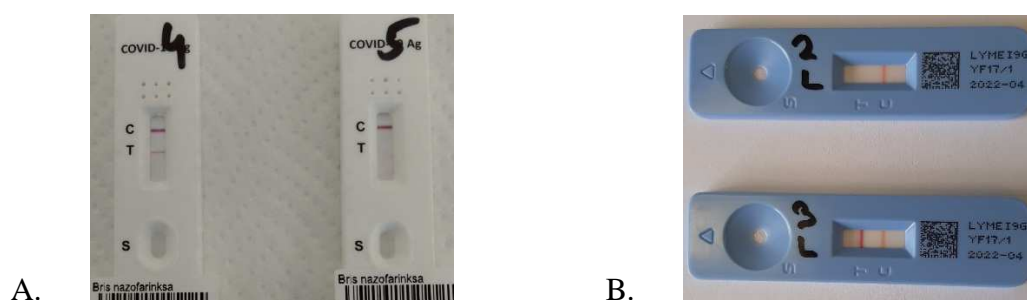
Kada se antitijelo kombinira s korpuskularnim antigenom, koji je dio bakterije, virusa, krvne stanice ili unutarnji dio stanice vezan s antigenom, dolazi do **aglutinacije**, što znači da se stvaraju nakupine. Aglutinini su primarno protutijela IgM. Antigeni mogu biti različiti sastojci koji su vezani za nosač. Nosač antigena mogu biti čestice lateksa ili eritrociti.



Slika 4. Test aglutinacije – RPR za dijagnostiku sifilisa - protutijela iz seruma s antigenom vezanim za karbonske čestice tvori aglutinate ili nakupine. Za definiranje titra radimo dvostruka serijska razrjeđenja seruma (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) i tražimo najveće razrjeđenje s pozitivnom aglutinacijom: prvi red = pozitivni titar 16; drugi red = negativno).

10.5 Imunokromatografski test

Imunokromatografski testovi (ICA) su jednostavni za korištenje i rezultat se očitava vizualno prema promjeni boje koja se pojavljuje na mjestu vezanja antigena i protutijela ubrzo nakon početka testiranja. Često se rade izvan laboratorija na mjestu pružanja skrbi kao *point-of-care* testovi (POCT), tj. testovi rezultat kojih je dostupan u vrijeme primarne obrade bolesnika pa pomažu u odluci o daljnjem liječenju. Testovi se mogu koristiti za dijagnostiku antigena ili kao indirektna dijagnostika za određivanje protutijela (12).



Slika 5. Imunokromatografski test – A. antigenski test; B. serološki test za protutijela

10.6 Imunoblot test / western blot

Test imunoblota ili western blot (WB) koristimo za detekciju specifičnih protutijela prema izdvojenim antigenima jednog uzročnika. Imunoblot testovi su visoko specifični, ali slabije osjetljivi nego imunoenzimski testovi. Testiranje se radi na nitroceluloznoj traci na kojoj se nalaze antigeni. Specifična protutijela iz seruma vežu se za antigene, a kompleksi se vizualiziraju pomoću obilježenih sekundarnih protutijela. Imunoblot testovi obično se koriste kao potvrdni nakon probirnog testiranja koje se radi nekom od prethodno navedenih metoda. Imunoblotom se potvrđuju, primjerice, protutijela na HIV, HCV, HEV, HSV-2 (13-15).

Diagnostics
Cypress, CA 90630, USA

HerpeSelect® 1 & 2 Immunoblot IgG Worksheet

Specimen ID (sera, control)	Developed Antigen Strips The following figure shows the approximate placement of the antigen bands. Use the developed Positive Control Strips as guides to the exact (lot-specific) location of the antigen bands. anti-human serum HSV common antigen gG1 gG2	Observed Bands				Interpretation
		anti-human serum	HSV common antigen	gG1	gG2	
RBS-34		+	∅	∅	∅	
RBS-54		+	+	∅	+	HSV2
RBS-57		+	+	+	+	HSV1 HSV2

Slika 6. Imunoblot potvrdni test za definiranje tipno specifičnih protutijela protiv HSV-1 i HSV-2. Rezultat se očitava prema reakciji na specifične glikoproteine gG1 i gG2, uz prisutna zajednička anti-HSV protutijela koja su preduvjet za dokaz HSV infekcije: traka 1 = negativan nalaz; traka 2 = HSV-2 pozitivno; traka 3 = HSV-1 i HSV-2 pozitivno

11. INTERPRETACIJA REZULTATA SEROLOŠKIH PRETRAGA

Serološki testovi pokazuju je li osoba bila izložena ispitivanom uzročniku. Imunosni odgovor na antigene je individualan. Serološki testovi nisu standardizirani. Rezultati i interpretacija nalaza ovise o metodi kojom se protutijela određuju. Prisutnost protutijela ne znači nužno akutnu infekciju. Negativan odnosno nereaktivan rezultat ne isključuje infekciju. Veoma je važno da se nalazi serološke dijagnostike uvijek interpretiraju u skladu s kliničkom slikom.

Rezultati seroloških testiranja označavaju se kao reaktivni ako je vrijednost iznad „normalne granice“, tj. granične vrijednosti testa (tzv. *cut-off* vrijednost). Granična vrijednost testa obično se definira prema rezultatima ispitivanja 95% zdrave populacije. Reaktivni rezultat upućuje na prisutnost protutijela u serumu ili pozitivan nalaz. Nereaktivan rezultat označava se kao negativan nalaz, a može biti zbog izostanka kontakta s istraživanim antigenom ili zbog niske, nemjerljive razine protutijela. Postoje osobe koje su slabi reaktori i stvaraju manje količine protutijela. U takvih osoba protutijela mogu biti nemjerljiva jer se granične vrijednosti za pozitivan nalaz određuju prema prosječnim vrijednostima iz ispitivane populacije.

Granični nalaz upućuje da se rezultat testiranja nalazi u rasponu vrijednosti koje su između pozitivnih i negativnih. Obično se uzima raspon od 10% iznad i ispod granične vrijednosti testa. Takav rezultat treba provjeriti novim testiranjem, testiranjem istog seruma drugom metodom i testiranjem parnog seruma. Testiranjem parnih seruma akutna infekcija se potvrđuje ili isključuje. Metode i referentne vrijednosti seroloških testova moraju biti navedene u nalazu.

Svaki rezultat serološke pretrage treba smatrati reaktivnim odgovorom specifičnih protutijela na antigen, ali značenje nalaza treba pažljivo sagledati u sklopu kliničke slike, anamnestičkih i epidemioloških podataka i procijeniti potrebu dodatnih seroloških potvrđnih testova (HIV, HCV, HEV, HSV-2). Za interpretaciju serološkog nalaza važno je znati vrijeme trajanja infekcije, specifičnost i osjetljivost testa, referentne vrijednosti korištenog testa te probleme mogućih lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata (13-15).

Mnogobrojna pitanja s kojima se susrećemo pri interpretaciji serološkog nalaza, upućuju na nužnu suradnju kliničara i mikrobiologa što će omogućiti pravilno tumačenje nalaza.

Tablica 2. Čimbenici važni za interpretaciju seroloških nalaza

ČIMBENICI VAŽNI ZA INTERPRETACIJU SEROLOŠKIH NALAZA
VRIJEME ODUZIMANJA UZORKA
KARAKTERISTIKE TESTA:
- kvalitativni / kvantitativni testovi
- jedinice izražavanja
- referentne vrijednosti testa
MOGUĆI LAŽNO POZITIVNI I LAŽNO NEGATIVNI REZULTATI

11.1 Vrijeme oduzimanja uzorka

Protutijela se mijenjaju tijekom bolesti pa će i nalaz ovisiti o vremenu nakon početka bolesti u kojem je uzorak uzet. Iako su serološke metode sve suvremenije i brže, specifičnije i

osjetljivije, interpretacija se i nadalje temelji na usporedbi rezultata parnih seruma. Akutnu infekciju dokazuje serokonverzija, značajan porast ili pad titra protutijela, specifičnost protutijela IgM te avidnost IgG. Nalaz IgM treba pravilno interpretirati zbog mogućih lažno pozitivnih i lažno negativnih nalaza.

Određivanje protutijela IgM uglavnom omogućava brzo postavljanje dijagnoze akutne bolesti. Reaktivni IgM, međutim, nije uvijek pokazatelj akutnosti. Procijeniti treba značajnost nalaza IgM zbog moguće interferencije reumatoidnog faktora, poliklonske aktivacije limfocita B, nejasne perzistencije IgM godinama nakon primarne infekcije ili tijekom trudnoće, odnosno križne reakcije zbog srodnosti antigena. Za potvrdu dijagnoze, uz definiranje IgM, treba dokazati serokonverziju ili značajan porast titra IgG u parnom serumu.

Prisutnost protutijela IgG bez IgM u jednom uzorku seruma pokazatelj je kontakta s antigenom u nedefinirano vrijeme. Ako se serum uzme kasnije tijekom bolesti, titar protutijela može biti visok. Značajno povišen titar specifičnih protutijela IgG (najmanje četiri puta veći od granične vrijednosti testa koji se izražava u titru, odnosno najmanje dva puta za imunoenzimski test) u serumu, koji je uzet u vremenu između akutne i rekonvalescentne faze bolesti ili tijekom rekonvalescencije, može upućivati na akutnu infekciju. Takav nalaz smatra se samo vjerojatnim dokazom infekcije. Nalaz visokog titra IgG nije siguran znak akutne bolesti.

11.2 Lažno pozitivni i lažno negativni rezultati

U interpretaciji seroloških nalaza moramo se suočiti s mogućom pojavom lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica utjecaja antiglobulina (npr. reumatoidnog faktora), križno reaktivnog odgovora, poliklonske aktivacije limfocita B te nekvalitetnog uzorka (ikteričan, hemolitičan, lipemičan, kontaminiran). Poliklonska stimulacija može biti potaknuta različitim čimbenicima, kao što su bakterijske upale (streptokok, mikoplazma), ali i sličnim zajedničkim antigenim determinantama. U akutnoj infekciji CMV može doći do poliklonske reakcije IgM na antigene EBV u osobe koja je ranije bila u kontaktu s EBV. Sličnost u antigenoj građi može dovesti do križnih reakcija na srodne antigene. Križne reakcije viđaju se, primjerice, između virusa herpes simpleks tipa 1 i tipa 2 (HSV-1 i HSV-2), HSV i VZV, HHV-6 i CMV te mumpsa i parainfluence. Ponekad je potrebno istovremeno testirati različite srodne uzročnike.

Pozitivni nalaz IgG nije nužno pokazatelj akutne infekcije jer može biti rezultat anamnestičkog odgovora ili posljedica pasivnog prijelaza protutijela IgG nakon transfuzija krvi i krvnih pripravaka ili vertikalni prijenos s majke na novorođenče.

Razlozi lažno negativnih rezultata također mogu biti različiti. Uzima li se uzorak u prvim danima nakon infekcije, protutijela se još nisu stvorila u mjerljivoj količini. U nekim testovima lažno negativni rezultat može nastati zbog kompeticije protutijela IgG i IgM za isto vezno mjesto na antigenu. Protutijela IgG vežu se brže i čvršće te mogu onemogućiti vezanje IgM što daje lažno negativni nalaz IgM. U lokaliziranim infekcijama ne mora doći do stvaranja velikih količina protutijela, već imunosni odgovor ostaje na lokalnoj razini. Tako u genitalnoj infekciji koja je uzrokovana herpesvirusom ili s *C. trachomatis*, imunosni odgovor ne mora u serumu biti značajno izražen. Rekurirajuće infekcije HSV ne stvaraju značajne promjene titra, pa se reaktivacija ne može dokazati određivanjem količine protutijela u parnim serumima.

Imunosuprimirane ili imunokompromitirane osobe mogu imati slabiji imunosni odgovor te protutijela mogu biti negativna u akutnoj infekciji ili se stvaraju sporo. I kod djece može doći do sporijeg imunosnog odgovora.

Tablica 3. Serološki kriteriji za dijagnostiku primarne infekcije

SEROLOŠKI KRITERIJI ZA DIJAGNOSTIKU PRIMARNE INFEKCIJE
1. SEROKONVERZIJA
2. ZNAČAJNI PORAST TITRA PROTUTIJELA U PARNIM SERUMIMA
3. PRISUTNOST IgM UZ PRAVILNU EVALUACIJU*
4. <i>VISOKI TITAR IgG (ili ukupnih protutijela) – nepouzdana vjerojatni kriterij; iznimno značajan za rijetke uzročnike</i>

* mogući problemi u interpretaciji: interferencija reumatoidnog faktora, reinfekcije, nejasna perzistencija IgM godinama nakon primarne infekcije ili u trudnoći, križne reakcije zbog sličnosti antigena

Za razliku od kemijskih testova koji su dobro standardizirani i moguće je brzo dobiti točan nalaz, serologija obuhvaća tzv. „biološke testove“ koji su pod utjecajem različitih čimbenika. Nalaz je često značajan nakon odgođenog ponekad predugog vremena da bi utjecao na tijek liječenja. Serološki rezultati ovise o osobitostima uzročnika i dinamici stvaranja protutijela. Za viruse kao što su, primjerice, hepatitis A, početak bolesti koincidira s nastankom protutijela IgM iza kojeg ubrzo slijedi stvaranje IgG, pa je serologija ključna dijagnostika. S druge strane brojni respiratorni i gastrointestinalni virusi razvijaju kliničku sliku prije nastanka protutijela te će za njih serološka dijagnostika biti retrospektivna i značajna za epidemiološka praćenja. Postoje i virusi, npr. HIV, koji kasno stvaraju klinički prepoznatljivu bolest, mjesecima i godine nakon serokonverzije. U tim je bolestima sama prisutnost protutijela dovoljna za postavljanje dijagnoze, ali je protutijela potrebno dokazati s dvije različite metode. Serologija se stoga smatra „potvrdom znanosti“. Niti jedan pozitivan serološki test nije sam za sebe pokazatelj akutnosti bolesti, bez obzira na visinu titra protutijela. Ako nema kliničkih simptoma, prisutnost reaktivnog odgovora protutijela neće biti dovoljna za postavljanje dijagnoze akutne bolesti. Važno je poznavati mogućnosti testova kojima se želi doći do definitivne dijagnoze. Serološke testove treba koristiti za potvrdu kliničke dijagnoze.

Literatura

1. Presečki V. Stomatološka mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb, 2009. str. 67-84.
2. Jenkinson HF. General Microbiology. Chapter 1, u Oral microbiology and immunology / editors Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. - 2nd ed, ASM Press Washington, 2014, str. 3-23.
3. Lydyard PM, M. F. Cole MF. The Immune System and Host Defense. Chapter 2, u Oral microbiology and immunology / editors Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. - 2nd ed, ASM Press Washington, 2014, str. 25-49.
4. Leys EJ, Griffen AL, Beall C, Maiden MF. Isolation, Classification, and Identification of Oral Microorganisms. Chapter 4, u Oral microbiology and immunology / editors Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. - 2nd ed, ASM Press Washington, 2014, str. 77-96.
5. Đaković Rode O. Mikrobiološka dijagnostika. U Lepur D. i sur. Infektologija. Naklada Slap, Zagreb, 2019, str. 13-36.
6. Tambić-Andrašević A. Laboratorijska dijagnostika zaraznih bolesti. Poglavlje 5, u Begovac J. i sur. Klinička infektologija. Medicinska naklada, Zagreb, 2019, str. 54-63.
7. Jawetz, Melnick i Adelberg Medicinska mikrobiologija (26. izd. /1. hrv. izd.) – Udžbenik; autori Brooks GF i sur.; Tonkić M, Dobec M, Abram M. (ur. hrv.izd.), Split 2015; McGraw-HillLange / Placebo: str. 123-148.
8. Fletcher HM, Aruni W, Dou Y, Progulske-Fox A. Applied Molecular Biology and the Oral Microbes, Chapter 8, u Oral microbiology and immunology / editors Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. - 2nd ed, ASM Press Washington, 2014, str. 177-183.
9. Sällberg M. Oral Virology, Chapter 16, u Oral microbiology and immunology / editors Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. - 2nd ed, ASM Press Washington, 2014, str. 305-335.
10. Corey L. et al. Handbook of diagnostic virology testing. 3rd ed, UW Medicine 2004, str. 29-40.
11. Korsman SNJ, van Zyl GU, Nutt L, Andresson MI, Presier W. Virology (An Illustrated Colour Text). Churchill Livingstone Elsevier, 2012, str. 27-31.

