

Heterogenost podtipova HIV-a i primarna rezistencija na antiretrovirusne lijekove u novodijagnosticiranih osoba iz Hrvatske tijekom 2013. godine

Ivana GRGIĆ, dr. sc., mag. molekularne biologije, znanstvena suradnica
Ana PLANINIĆ, mag. molekularne biologije, znanstvena novakinja
Lana GORENEC, mag. molekularne biologije, znanstvena novakinja
Adriana VINCE, prof. dr. sc., dr. med., specijalist infektolog i citolog
Josip BEGOVAC, prof. dr. sc., dr. med., specijalist infektolog
Snježana ŽIDOVEC LEPEJ, dr. sc., mag. molekularne biologije, znanstvena savjetnica

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

Ključne riječi

HIV
podtipovi
primarna rezistencija
mutacije

Key words

HIV
subtypes
primary resistance
mutations

Primljeno: 2013–10–16

Received: 2013–10–16

Prihvaćeno: 2013–11–20

Accepted: 2013–11–20

Znanstveni rad

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti heterogenost podtipova HIV-a te analizirati primarnu rezistenciju virusa na antiretrovirusne lijekove u 30 prethodno ne-liječenih osoba koje su uključene u kliničku skrb Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a tijekom 2013. g. Sekvenciranjem *pol* gena HIV-a te primjenom bioinformatičkih algoritama određeni su podtipovi virusa te detektirane mutacije povezane s primarnom rezistencijom na antiretrovirusne lijekove. Većina ispitanika (86,7 %) bila je zaražena podtipom B. Otkriveno je 12 mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove, tj. 9 mutacija povezanih s primarnom rezistencijom na nukleozidne analoge inhibitora reverzne transkriptaze (NRTI) te 3 mutacije povezane s rezistencijom na nenukleozidne inhibitora reverzne transkriptaze (NNRTI). Primarna rezistencija na dvije klase antiretrovirusnih lijekova (NRTI i NNRTI) otkrivena je u jednog ispitanika. Najzastupljenija mutacija povezana s primarnom rezistencijom virusa na lijekove bila je T215S (rezistencija na NRTI). Mutacije značajne za nastanak primarne rezistencije detektirane su u 4 osobe zaražene podtipom B, jedne osobe zaražene podtipom A1 te jedne osobe zaražene rekombinantom podtipova A1 i B. U ovom je istraživanju po prvi puta dokazana pojava primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u osobi zaraženih non-B podtipovima virusa iz Hrvatske.

HIV subtype diversity and primary resistance to antiretroviral drugs in newly diagnosed HIV-infected persons from Croatia in 2013

Scientific paper

The aim of this study was to analyse HIV subtype diversity as well as primary resistance to antiretroviral drugs in 30 treatment-naive individuals entering clinical care at the National Reference Center for HIV/AIDS during 2013. Sequencing the *pol* region of the viral genome and bioinformatic algorithms were used to determine HIV subtypes and to analyse transmitted drug resistance mutations. The majority of individuals (86,7 %) were infected with HIV-1 subtype B. Twelve mutations associated with primary resistance to antiretroviral drugs were detected in the study: 9 mutations conferring resistance to NRTI (nucleotide reverse-transcriptase inhibitors) and 3 mutations associated with resistance to NNRTI (non-nucleotide reverse-transcriptase inhibitors). Primary resistance to two antiretroviral drug classes (NRTI and NNRTI) were detected in one individual. The most frequent mutation was T1215S associated with primary resistance to NRTI. Drug resistance mutations were detected in 4 subtype B and 2 non-B HIV-infected individuals. This study showed, for the first time, the presence of mutations associated with primary resistance of HIV to antiretroviral drugs in individuals infected with non-B subtypes in Croatia.

Uvod

Nepotpuna supresija virusne replikacije u osoba zaraženih HIV-om liječenih antiretrovirusnim lijekovima najčešće se povezuje s nastankom rezistencije. Rezistencija nastala kao posljedica selektivnog pritiska antiretrovirusnih lijekova naziva se sekundarnom ili stečenom rezistencijom. Zaraza rezistentnim kvazispicijesima virusa u osoba koje nisu prethodno liječene naziva se primarnom rezistencijom HIV-a na lijekove [1, 2].

Pravovremeno otkrivanje primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove (prije započinjanja antiretrovirusnog liječenja) iznimno je značajno za pravilan odabir učinkovite kombinacije lijekova. Stoga je praćenje prevalencije primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u različitim zemljama kao i određivanje najčešćeg obrasca mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-a danas iznimno značajno područje istraživanja u molekularnoj virusologiji [3].

Nacionalna istraživanja prevalencije primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Europi pokazuju raspon prevalencije od 0 do 25 % što se, barem djelomično, povezuje i s razlikama u metodologiji pojedinih istraživanja [8-11]. Primarna rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove u osoba koje su uključene u kliničku skrb Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske u razdoblju od 2006. do 2008. g. iznosila je 22 % [12]. U SAD-u, prevalencija primarne rezistencije u pojedinim savezima država kreće se u rasponu od 7 do 23 %, u Australiji iznosi oko 16 % dok je u nerazvijenim zemljama svijeta (Afrika, Azija i Južna Amerika) niska i iznosi oko 3,7 % [4-7].

HIV-1 je u molekularnom smislu iznimno heterogeni virus koji se klasificira u četiri grupe: M ("major"), N ("non M"; "non-O"), O ("outlier") i P [13]. Grupa M HIV-a odgovorna je za pandemiju HIV infekcije i dijeli se na 9 podtipova i 58 cirkulirajućih rekombinantnih oblika, CRF (engl. *circulating recombinant forms*), a genskoj složenosti HIV-1 pridonosi i velik broj otkrivenih jedinstvenih rekombinantnih oblika, URF (engl. *unique recombinant forms*) [14, 15].

Najveći broj osoba zaraženih HIV-om u svijetu zaražen je podtipom C koji je najčešći u subsaharskoj Africi, Indiji i Nepal. Najrasprostranjeniji je podtip B HIV-a koji je najčešći u zaraženih osoba iz Europe, Amerike, Australije, Japana i Tajlanda. Podtip A široko je rasprostranjen u zapadnoj Africi i istočnoeuropskim zemljama dok je podtip D najčešći u istočnoj i središnjoj Africi. Podtip E ne dolazi samostalno već isključivo u obliku rekombinante s podtipom A tj. kao CRF01_AE. Najviše osoba zaraženih podtipom F živi u zemljama Južne Amerike, središnje Afrike i u istočnoj Europi. Infekcija podtipom H najčešća je u zemljama središnje Afrike, podtipom J u Africi i na Karibima dok je infekcija podtipom K ograničena na Kongo i

Kamerun. Podtip G i njegova rekombinantna forma CRF02_AG najčešći su u Africi i središnjoj Europi. Pojedini podtipovi HIV-a dijele se na dvije skupine poput podtipa A (na A1 i A2) i F (na F1 i F2) [16-18].

Grupa O HIV-a ograničena je na zapadnu i središnju Afriku, a posebice Kamerun gdje otprilike 2 % izolata pripada toj skupini. Grupa N HIV-a dokazana je isključivo u Kamerunu i do sada je opisano svega desetak izolata koji pripadaju toj grupi. Grupa P HIV-a otkrivena je 2009. g. u izolatu osobe zaražene HIV-om iz Kameruna koja živi u Francuskoj [13].

Pojedini podtipovi HIV-a povezani su i s određenim načinima prijenosa virusa. Primjerice, u zapadnoj Europi infekcija podtipom B povezuje se s epidemijom HIV-a u skupini muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM) dok su non-B podtipovi HIV-a najčešći u heteroseksualnih osoba [19-22].

Objavljeno je nekoliko istraživanja o distribuciji podtipova HIV-a tipa 1 u Hrvatskoj koje pokazuju da je najzastupljeniji podtip B [12, 23-26].

Ramirez-Piedad i sur. su 2009. g. analizirali distribuciju podtipova HIV-a u Hrvatskoj i pokazali da je 74 % infekcija uzrokovano podtipom B virusa. Non-B podtipovi bili su dokazani isključivo u heteroseksualnih ispitanika, a prevalencija podtipa B u pomoraca i njihovih stalnih seksualnih partnerica iznosila je samo 29 % [24].

Istraživanje prevalencije HIV infekcije u MSM osoba iz Zagreba metodom RDS-a (engl. *respondent-driven sampling*) provedeno je u dva ciklusa (2006. i 2010. g.). Prevalencija zaraze HIV-om u oba istraživanja bila je manja od 5 %, a svi MSM ispitanici kod kojih je dokazana zaraza HIV-om u ovom istraživanju bili su zaraženi podtipom B [25, 26].

Visoku prevalenciju infekcije podtipom B HIV-a u Hrvatskoj pokazali su i rezultati istraživanja Grgić i sur. u kojem je infekcija non-B podtipovima dokazana u samo 11 % ispitanika [12].

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti distribuciju podtipova HIV-a te analizirati primarnu rezistenciju virusa na antiretrovirusne lijekove u prethodno neliječenih osoba iz Hrvatske koje su uključene u kliničku skrb Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV infekcije Republike Hrvatske tijekom 2013. g.

Ispitanici i metode

Ispitanici

U istraživanje je uključeno 30 HIV-om zaraženih osoba koje su tijekom 2013. g. ušle u kliničku skrb Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV infekcije Republike Hrvatske. Osobe uključene u istraživanje nisu

bile prethodno liječene antiretrovirusnim lijekovima, a viremija svih ispitanika bila je veća od 1000 kopija HIV-1 RNK po mL plazme.

Metode

Virusna RNK iz plazme ispitanika izolirana je primjenom standardiziranog kompleta reagensa QIAamp Viral RNK Mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).

Sekvencu dijela *pol* gena HIV-a tipa 1 (918 nukleotida, kompletan gen koji kodira sintezu virusne proteaze, tj. nukleotidi od 1 do 99 te dio gena koji kodira sintezu reverzne transkriptaze, tj. nukleotidi od 41 do 223) određena je primjenom Sangerove dideoksi metode sekvenciranja uz primjenu reagensa Trugene HIV-1 Genotyping kit (Siemens Medical Solutions, SAD).

Usporedbom dobivene sekvence virusa sa sekvencom referentnog soja (LAV) detektirane su mutacije važne za nastanak rezistencije na antiretrovirusne lijekove. Klinička značajnost detektiranih mutacija analizirana je primjenom WHO algoritma prema Benett i sur. (2009.) [27].

U istraživanju su analizirane mutacije povezane s primarnom rezistencijom HIV-a na nukleozidne analoge inhibitora reverzne transkriptaze (NRTI), nenukleozidne inhibitora reverzne transkriptaze (NNRTI) i inhibitora proteaze (PI).

Podtipovi HIV-a određeni su analizom sekvence *pol* gena uz primjenu bioinformatičkog algoritma HIV-1 REGA Subtyping tool (Katholieke Universitat Leuven, Belgija).

Rezultati

Primarna rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Sekvence *pol* gena 30 HIV-om zaraženih osoba (28 muškaraca i 2 žene) uspoređene su sa sekvencom referentnog soja HIV-a osjetljivog na sve antiretrovirusne lijekove, a klinička značajnost otkrivenih mutacija interpretirana je primjenom WHO algoritma.

Ukupno je otkriveno 12 mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-a na lijekove, tj. 9 mutacija povezanih s primarnom rezistencijom na NRTI te 3 mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI (Tablica 1.). Mutacije značajne za nastanak rezistencije na inhibitora proteaze nisu detektirane.

Mutacije su detektirane u 6 od 30 ispitanika od kojih je u dvoje detektirana po jedna mutacija, a dvoje ispitanika imalo je po dvije mutacije. U dvoje ispitanika detektirane su po 3 mutacije povezane s primarnom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove. Primarna rezistencija na dvije klase antiretrovirusnih lijekova (NRTI i NNRTI) otkrivena je u samo jednog ispitanika.

Tablica 1. Mutacije povezane s primarnom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Table 1. Mutations associated with primary HIV antiretroviral drug resistance

Ispitanici / Examinees	Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI / NRTI-associated mutations	Mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI / NNRTI-associated mutations
1	M41L, T215S	
2		K101E
3	M184V	K101P, K103S
4	M41L, L210W, T215D	
5	M41L, T215S	
6	T215S	

– NRTI, nukleozidni analozi inhibitora reverzne transkriptaze/ nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze/ non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors

Tablica 2. Distribucija podtipova HIV-a

Table 2. Distribution of HIV subtypes

Podtip HIV-a / HIV subtype	Broj ispitanika / Number of examinees (n=30)
B	26/30
A1	1/30
G	1/30
A1/B	1/30
C/A1	1/30

Najčešća mutacija povezana s primarnom rezistencijom na antiretrovirusne lijekove bila je T215S koja samostalno ne uzrokuje klinički značajnu rezistenciju virusa na lijekove već predstavlja molekularni biljeg prijenosa rezistentnog virusa koji je imao mutaciju T215Y (tzv. revertantska mutacija). T215Y uzrokuje rezistenciju na zidovudin i stavudin te smanjenu osjetljivost na abakavir, didanozin i tenofovir.

Distribucija podtipova HIV-a

Podtip B detektiran je u 26/30 (86,7 %) pacijenata dok je dvoje pacijenata (6,7 %) bilo zaraženo non-B podtipovima grupe M (genotipovi A1 i G) (Tablica 2.). Dvije sekvence *pol* regije HIV-1 s non-B podtipovima bile su rekombinantne podtipova virusa (A1 i B; C i A1).

Mutacije značajne za nastanak primarne rezistencije detektirane su u 4 osobe zaražene podtipom B, jedne osobe zaražene podtipom A1 te jedne osobe zaražene rekombinantom između A1 i B.

Diskusija

Molekularna analiza *pol* regije genoma HIV-a u prethodno neliječenih osoba iz Hrvatske koje su u kliničku skrb uključene 2013. g. dokazala je primarnu rezistenciju HIV-a na NRTI i NNRT. Najčešća mutacija povezana s primarnom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove bila je T215S. Većina HIV-om zaraženih osoba bila je zaražena podtipom B HIV-a.

Rezultati genotipizacije HIV-a u ispitanika uključenih u ovo istraživanje potvrđuju da je podtip B i dalje najčešći u zaraženih osoba iz Hrvatske. Međutim, i dalje su prisutni non-B podtipovi virusa što dokazuje molekularnu heterogenost HIV-infekcije u Hrvatskoj. Raspodjela podtipova HIV-a u Hrvatskoj usporediva je s onom u većini zemalja zapadne Europe kao i s nekim zemljama južne i jugoistočne Europe [28].

Božičević i Begovac su analizirali epidemiju HIV-a u MSM iz zemalja jugoistočne Europe te pokazali da je 2008. g. čak 76 % novodijagnosticiranih zaraženih osoba u Hrvatskoj pripadalo MSM skupini [23]. Grgić i sur. su u istraživanju o primarnoj rezistenciji HIV-a u Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2008. g. pokazali da je 89 % ispitanika bilo zaraženo podtipom B te da je 80 od 118 pripadalo MSM skupini [12].

U istraživanju Ramirez Piedad i sur. non-B podtipovi bili su ograničeni na HIV-om zaražene osobe iz heteroseksualne skupine. U ovom su istraživanju non-B podtipovi dokazani u 4 osobe od koje su dvije žene dok kod većine novodijagnosticiranih zaraženih osoba dominira infekcija podtipom B virusa [24].

Prevalencija primarne rezistencije u neliječenih HIV-om zaraženih osoba u Europi prati se od 2002. g. u sklopu projekta SPREAD. Vercrauteren i sur. su 2009. g. objavili rezultate određivanja primarne rezistencije na antiretrovirusne lijekove u neliječenih osoba u kojih je zaraza HIV-om dokazana u razdoblju od 2002. g. do 2005. g. U istraživanje su bili uključeni laboratoriji iz 20 europskih zemalja te Izraela, a ukupna prevalencija primarne rezistencije HIV-a prema ovom istraživanju iznosila je 8,4 % [29].

Prvo istraživanje o prevalenciji primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Hrvatskoj objavljeno je 2013. g. Istraživanje Grgić i sur. pokazalo je visoku prevalenciju primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Hrvatskoj (22 %), posebice u usporedbi s rezultatima istraživanja Vercrauteren i sur. [29]. Visoka prevalencija primarne rezistencije u Hrvatskoj u razdoblju koje je obuhvatilo istraživanje Grgić i sur. povezuje se s postojanjem transmisijskih grupa podtipa B u MSM HIV-om zaraženih osoba koji nose mutaciju T215S12.

Rezultati ovog istraživanja provedenog 2013. g. pokazali su postojanje virusnih kvazispicijesa koji su rezistentni na antiretrovirusne lijekove u prethodno neliječenih

novodijagnosticiranih osoba iz Hrvatske. Usporedba učestalosti mutacija povezanih s primarnom rezistencijom na antiretrovirusne lijekove u istraživanju Grgić i sur. i u ovom istraživanju pokazuje da je mutacija T215S i dalje najčešća mutacija povezana s primarnom rezistencijom u Hrvatskoj. Međutim, u istraživanju Grgić i sur. mutacija T215S bila je dokazana isključivo u ispitanika zaraženih podtipom B virusa (uglavnom iz MSM skupine). Rezultati ovog istraživanja po prvi su puta pokazali pojavu primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u osoba zaraženih non-B podtipovima (ispitanici zaraženi podtipom A1 te A1/B).

Zaključak

U novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba iz Hrvatske tijekom 2013. g. dominira infekcija podtipom B. Primarna rezistencija na NRTI i/ili NNRTI otkrivena je u 6 od 30 ispitanika, a najčešća mutacija je T215S. U ovom je istraživanju po prvi puta dokazana pojava primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u osoba zaraženih non-B podtipovima virusa.

Literatura

- [1] Peters BS, Conway K. Therapy for HIV: past, present, and future. *Adv Dent Res* 2011;23:23–7.
- [2] Cane PA. New developments in HIV drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009;64 Suppl 1:i37–40.
- [3] Menedez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Research* 2010;85:210–231.
- [4] Chan PA, Tashima K, Cartwright CP, i sur. Short communication: Transmitted drug resistance and molecular epidemiology in antiretroviral naive HIV type 1-infected patients in Rhode Island. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27:275–81.
- [5] Goldsamt LA, Clatts MC, Parker MM, i sur. Prevalence of sexually acquired antiretroviral drug resistance in a community sample of HIV-positive men who have sex with men in New York City. *AIDS Patient Care STDs* 2011;25:287–93.
- [6] Russell JS, Chibo D, Kaye MB, i sur. Prevalence of transmitted HIV drug resistance since the availability of highly active antiretroviral therapy. *Commun Dis Intell* 2009;33:216–20.
- [7] Myers JE, Taylor BS, Rojas Fermin RA, i sur. Transmitted drug-resistance among antiretroviral naive patients with established HIV-1 infection in Santo Domingo, Dominican Republic and review of the Latin American and Caribbean literature. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28:667–74.
- [8] Paraschiv S, Otelea D, Dinu M, i sur. Polymorphisms and resistance mutations in the protease and reverse transcriptase genes of HIV-1 F subtype Romanian strains. *Int J Infect Dis* 2007;11:123–8.
- [9] Yerly S, von Wyl V, Ledergerber B, i sur. Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 2007;21:2223–29.

- [10] Paraskevis D, Magiorkinis E, Katsoulidou A, i sur. Prevalence of resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Greece. *Virus Res* 2005;112:115–22.
- [11] Audelin AM, Gerstoft J, Obel N, i sur. Molecular Phylogenetics of Transmitted Drug Resistance in Newly Diagnosed HIV Type 1 Individuals in Denmark, a Nation-Wide Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27:1283–90.
- [12] Grgic I, Lepej SZ, Lunar MM, i sur. The prevalence of transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV-infected individuals in Croatia: the role of transmission clusters of men who have sex with men carrying the T215S surveillance drug resistance mutation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013;29:329–36. doi: 10.1089/AID.2012.0191.
- [13] Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, i sur. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15:871–872.
- [14] Leitner T, Korber B, Daniels M, Calef C, Foley B. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. In *HIV Sequence Compendium 2005*;41–48. Edited by: Leitner T, Foley B, Hahn B, et al. Published by: Theoretical Biology nad Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, 2005. NM. LA-UR 06-0680
- [15] The Circulating Recombinant Forms (CRFS), Available at: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRF.html>
- [16] Hemelaar J, Gouws E, Ghys P, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006;20:W13–23.
- [17] Hemelaar J, Gouws E, Ghys P, i sur. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 2011;25:679–89.
- [18] Paraskevis D, Hatzakis A. Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection. *AIDS Rev* 1999;1:238–49.
- [19] Aleus A. Significance of HIV-1 Genetic Subtypes. *Scand J Infect Dis* 2000;32:455–63.
- [20] Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:22–27.
- [21] Giuliani M, Montieri S, Palamara G, i sur. Non-B HIV type 1 subtypes among men who have sex with men in Rome, Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:157–64.
- [22] Riva C, Lai A, Caramma I. Transmitted HIV Type 1 drug resistance and Non-B subtypes prevalence among seroconverters and newly diagnosed patients from 1992 to 2005 in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26:41–9.
- [23] Bozicevic I, Begovac J. The emerging HIV epidemic among men who have sex with men in southeastern Europe. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Dec;8(12):1351–8.
- [24] Ramirez Piedad M, 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.
- [25] Zidovec Lepej S, Baca Vrakela I, Poljak M, Bozicevic I, Begovac J. Phylogentic analysis of HIV sequences obtained in a respondent-driven sampling study of men who have sex with men. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:1335–8.
- [26] Bozicevic I, Dakovic Rode O, Zidovec Lepej S, i sur. Prevalence of sexually transmitted infections among men who have sex with men in Zagreb, Croatia. *AIDS Behavior* 2009;13:303–9.
- [27] Bennett DE, Camacho R, Otelea D, i sur. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance: 2009 update. *PLoS ONE* 4(3): e4724.
- [28] Stanojevic M, Alexiev I, Beshkov D, i sur. HIV 1 molecular epidemiology in the Balkans: a melting pot for high genetic diversity. *AIDS Rev* 2012;14:28–36.
- [29] Vercautern J, Wensing AMJ, van de Vijver DAMC, i sur. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 2009; 200:1503–8.

Instructions to Authors

Infektološki glasnik publishes editorials (significant scientific and professional events), original professional and scientific papers, preliminary reports, review articles, reports from scientific gatherings, comments, news from medicine, book reviews, reports from scientific meetings, letters to the editor etc.

Papers categorized and accepted for publication oblige the author not to republish the paper elsewhere without the Editor's consent and information where the paper was published first.

Manuscripts should be submitted to: *Infektološki glasnik*, Zagreb, Mirogojska 8.

Instructions to authors are in accordance with the text – International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *Ann Intern Med* 1988;108:258-65 and comply with Instructions to Authors published in *Liječnički Vjesnik* where they were taken from.

1. Manuscript

The entire manuscript including all additions must be submitted in triplicate (besides the original, other sets of figures and tables can be printed out). The manuscript must be double spaced with up to 30 rows on each page and with left margin of 4 cm.

Review articles and original papers can be up to 15 typed pages long and case reports up to 8 pages with all additions. Manuscripts should take the following form:

1.1. The title should be in Croatian and English typed on a separate page with the author's full name and accurate name of the institution where the research was carried out. At the bottom of the page the address of the author responsible for correspondence should be written which will be later on published in the article. It is necessary that the authors provide a short version of the title up to 40 characters for running heads.

1.2. The summary is to be submitted on a separate page, with no more than 150 words. It must include all relevant information presented in the paper: the aim of the work, methods, relevant results with numerical data, basic conclusions.

1.3. Summary in English is written on a separate page containing also the paper's title in English. Untranslated or poorly translated summaries will be translated or revised by the English language editor at the author's expense. Untranslated summaries can be submitted too.

1.4. Key words. On the page containing Croatian i.e. English summary, below the text, there should be 2–5 key words relevant for prompt identification and classification of the paper's content.

1.5. The introduction should be brief, clearly presenting the problem and the aim of the research. Other papers directly related to the presented problem should be briefly mentioned.

1.6. The methods used during research should be short but clear enough so the reader can repeat the described research. Methods known from literature should not be described, only their original references should be stated. Drugs should be indicated by their generic name.

1.7. The results of the research should be clearly and precisely presented and their significance should be statistically elaborated. SI units should be used.

1.8. Discussion and conclusions. The aim of the discussion is to interpret the results and compare them with the already known results from the same field which can bring about clear conclusions.

1.9. A separate page should contain academic degree, name and address of affiliated institution for all authors.

2. Tables and Figures

The paper should be accompanied with a reasonable number of tables and figures; only representative drawings documenting the work should be added.

The tables' titles, descriptions of figures and textual part of the tables and figures should be in both Croatian and English.

2.1. Tables. Each table should be shown on a separate page with its ordinal number connecting it to the text and a heading. Vertical column headings should be avoided. Instead, roman numerals or capital letters denoting each column should be used and explained in legends at the bottom of the table. Abbreviations should not be used in tables except for the usual units of measurement.

2.2. Figures. Each figure is also numbered in the order in which it appears in the text. Figure descriptions – legends – are typed on a separate page, also according to their ordinal number.

Photographs in black and white should be submitted on glossy paper. On the back of each photograph place a label or write lightly in pencil the photo's number and the paper's title without the names of authors. Indicate the top edge of the photos. It is recommended that significant parts of the photos are marked with arrows (Letraset, e.g.). Patients should have their eyes covered with a black tape so they cannot be identified from the photos.

Drawings should be made in ink on white or tracing paper and submitted in original (not photographs or copies). Letters and signs must be clear in suitable thickness, and large enough to be fully legible after reduction.

Copies of tables and figures can be submitted only with copies of the paper.

Publication of figures and tables from other sources must be accompanied with the permission of their publisher and author.

3. References

References, written on a separate sheet of paper, should be listed numerically in the order cited in the text (the first reference in the paper is number [1]). Paper citations must include all authors.

References should be cited in the following manner:

Journal article (provide names of all authors when there are 6 or fewer; if there are 7 authors or more, list only the first three and add: et al.):

Golubić D, Rapić D, Breitenfeld V. Neka klinička, dijagnostička i terapijska zapažanja o humanoj trihinelozu. *Liječ Vjesn* 1985;107:11–4.

Group of authors

The Royal Marsden Hospital Bone-Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in posthepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:242–4.

Anonymous

Anonimno. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981;283:628.

Journal supplement

Lundstrom I, Nylander C. An electrostatic approach to membrane bound receptors. *Period Biol* 1983;85 (suppl2):53–60.

Journal according to the number of issue

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16(Sep):24–5.

Books or works, Individual author(s)

Eisen HN. Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response. 5. izd. New York: Harper and Row, 1974:406.

Editor

Dausset J, Colombani J, ur. Histocompatibility testing 1972. Copenhagen: Munksgaard, 1973:12–8.

Chapter of a book

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. U: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, ur. Pathogenic physiology: mechanism of disease. Philadelphia: W B Saunders, 1974: 457–72.

Proceedings

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. U: White HJ, Smith R, ur. Proceedings of the third annual meeting of the International Society for Experimental Haematology. Houston: International Society for Experimental Haematology, 1974:44–6.

One work of a series

Hunninghake GW, Gadek JE, Szapiel SV, i sur. The human alveolar macrophage. U: Harris CC ur. Cultured human cells and tissues in biomedical research. New York: Academic Press, 1980:54–6. (Stoner GD, ur. Methods and respectives in cell biology ; vol 1).

Publications of agencies, societies etc.

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States-1975. Hyattsville, Maryland: National Centre for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS)78–1785. (Vital and health statistics; series 13; no 34).

Dissertation or thesis

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 str. Disertacija.

Other articles, Newspaper article

Martinović S. Dnevno boluje sto tisuća zaposlenih. *Vjesnik* 1985 Feb 19:5(col 1).

Magazine articles (periodical publications)

Wallis C. Chlamydia: the silent epidemic. *Time* 1985 Feb 4:33.

Titles of journals should be abbreviated according to abbreviations used by the Index Medicus.

In an accompanying letter, the main author should confirm that all authors have seen and approved the manuscript, and that the same paper has not been published or accepted for publication in any other journal or book. Permission to reproduce figures and tables previously published in other journals or books must be cleared with the publisher and author.

Editorial Board will send the submitted manuscripts to two anonymous revisions.

If the reviewer proposes changes or additions, the copy of the revised manuscript, without the name of the reviewer, will be sent to the author for his/her final decision and correction.

The Editor is not obliged to publish papers according to their order of arrival. Statements expressed present the author's opinion.

Manuscripts cannot be returned.

The content of *Infektološki Glasnik* may be republished with a note »taken from *Infektološki Glasnik*«.