

آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن pol (سکانس RT) ویروس HIV-1 در بین بیماران مبتلا به ایدز در ایران

کاظم باعشی^۱، مهرداد روانشاد^۲، سید یونس حسینی^۱، محبوبه حاجی عبدالباقی^۳، کیانا شاهزمانی^۴

چکیده

سابقه و هدف

ویروس نقص ایمنی اکتسابی، یکی از اعضای خانواده رتروویریده می‌باشد که به عنوان عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی شناخته شده است. توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیک ژن pol ویروس نقص ایمنی اکتسابی، یک روش مفید برای تعیین تحت گونه‌ای سویه‌ها می‌باشد. در این پژوهش، هدف بررسی سویه‌های ویروس HIV-1 موجود در ایران بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. ژنوم RNA، از پلاسمای ۲۴ بیمار مبتلا به ایدز از مرکز تحقیقات ایدز بیمارستان امام خمینی استخراج گردید و با استفاده از روش RT Nested-PCR و استخراج از ژل محصولات PCR، سکانس‌یابی و آنالیز فیلوژنتیک با نرم افزار مگا ۴ انجام و تفاوت‌های سکانس‌های RT بین سویه‌های ویروس HIV-1 به دست آمده از بیماران بررسی شد.

یافته‌ها

پس از انجام توافق ترادفی توالی‌ها با توالی‌های رفرانس، آنالیز سکانس‌ها و فیلوژنتیک نشان داد که ۱۴ نمونه تحت گونه A1 و ۱۰ نمونه تحت گونه B از گروه M ویروس HIV-1 می‌باشند.

نتیجه‌گیری

سویه A1 بیشتر در افراد معتاد به مواد مخدر تزریقی و سویه B در افراد هموفیلی مشاهده شد. نتایج نشان داد که احتمالاً تحت گونه A1 شایع‌ترین تحت گونه در بین بیماران است. مانند سایر تحقیقات انجام شده در کشورهای دیگر، آنالیز فیلوژنتیک می‌تواند در استراتژی پیشگیری، درمان، کنترل و برنامه‌ریزی‌ها مفید باشد.

کلمات کلیدی: ویروس نقص ایمنی اکتسابی تیپ ۱، ایران، تنوع ژنتیکی

تاریخ دریافت: ۸۷/ ۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۵

۱- دانشجوی PhD ویروس شناسی - دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۲- مؤلف مسؤول: PhD ویروس شناسی - استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

۳- PhD بیماری‌های عفونی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - مرکز تحقیقات ایدز بیمارستان امام خمینی

۴- PhD ویروس شناسی - استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران - مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی

مقدمه

ویروس HIV یکی از اعضای خانواده رتروویریده می باشد. یک ذره کروی با قطر حدود ۱۰۰ نانومتر، دارای ژنوم با پلاریته مثبت و پوشینه لیپیدی متشکل از دو لایه مولکول چربی است که از غشای پلاسمایی سلول میزبان و در حین جوانه زدن ذره ویروسی حاصل می شود (۱، ۲). ویروس HIV دارای تغییرات ژنتیکی بسیار بالایی است که در نتیجه خطای آنزیم RT می باشد و بدون فعالیت تصحیح، انجام می شود (۳).

فیلوژنتیک، فرآیندی از بازسازی ارتباط تکاملی ممکن و محتمل از سکانس های نوکلئوتیدی غیر متغیری است که منعکس کننده شباهت های ژنتیکی و ارتباط تکاملی می باشند و به عنوان زمان سنج های مولکولی عمل می نمایند. مواردی از کاربردهای فیلوژنتیک، ترسیم ارتباط فیلوژنی ارگانیسم ها و مارکرها و امکان آرایه آن به بیننده در یک نگاه، تخمین زمان شاخه شاخه شدن، بازسازی پروتئین های قدیمی، تشخیص نقاط نوترکیبی (روش جدید Bayesian نوترکیبی HIV را تشخیص می دهد)، ترسیم ارتباط اجدادی، تشخیص پاتوژن های جدید، مشاهده اپیدمیولوژیکی و آنالیز تغییرات در گونه های ویروسی می باشد (۴).

تحلیل فیلوژنتیکی این ویروس در سراسر جهان سه گروه ژنتیکی O، M و N را نشان می دهد. گروه M به ۸ تحت تیپ (A-J) تقسیم می شود که حدوداً ۹۵ درصد سوش های HIV-1 را به خود اختصاص داده است. زیر گروه B شایع ترین زیر گروه ویروسی در اروپا می باشد (۶، ۵). تحت تیپ های A و G در غرب آفریقا و تحت تیپ C در آفریقای جنوبی غالب می باشند. در هندوستان و در کشورهای جنوب شرقی آسیا، تحت تیپ های C، B و E غالب هستند (۷، ۸).

شیوع HIV در ایران، یک وضعیت هشدار دهنده و در حال افزایش دارد. با توجه به این که راه اصلی انتقال در جهان از طریق جنسی است، در ایران راه انتقال اصلی از طریق مصرف کنندگان مواد مخدر تزریقی حدود ۶۹/۹ درصد می باشد. ۲۵/۵ درصد به صورت ناشناخته، ۷/۵ درصد از طریق تماس جنسی، ۱/۷ درصد از طریق

داروهای مشتق از پلاسمای انسانی و ۰/۴ درصد از طریق مادر به جنین درگیر شده اند. بر اساس گزارش ها، حدود ۱۶۰۰۰-۳۶۰۰۰ با میانگین ۶۶۰۰۰ نفر در ایران به HIV آلوده هستند و تا سال ۲۰۰۷، به طور متوسط ۱۷۶۰ نفر به علت ایدز از بین رفته اند (۹، ۱۰). در این پژوهش، هدف بررسی سویه های ویروس HIV-1 موجود در ایران بود. آنالیز فیلوژنتیک ژن pol نیز می تواند یک روش مناسب برای تعیین تحت گونه HIV باشد (۱۱-۱۳).

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

نمونه گیری و شرایط نگهداری نمونه:

بر اساس یک نمونه گیری ساده، پلاسمای ۲۴ بیمار مبتلا به ایدز که تحت درمان بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. این نمونه ها از بیماران در حال درمان مرکز تحقیقات ایدز بیمارستان امام خمینی تهیه شد. نمونه ها شامل ۲۰ (۸۴٪) مرد و ۴ (۱۶٪) زن بودند.

حدود ۷ سی سی خون محیطی بیماران مبتلا به ایدز، در لوله های استریل دارای ماده ضد انعقاد (EDTA با غلظت ۱ mg/ml) ریخته شد. سپس برای جداسازی پلاسما، لوله ها با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ و در نهایت با استفاده از سمپلر، پلاسما به درون لوله های اپندورف استریل منتقل گردید. کلیه نمونه ها بعد از تهیه شدن در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ابتدا تعداد زیادی ژنوتیپ های مختلف HIV-1 و سکانس های مربوطه، از بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnical Information) جمع آوری گردید و با استفاده از هم ردیف سازی چند گانه (multiple alignment) و بهره گیری از نرم افزارهای Alignment software برای دسته بندی چند گانه و مقایسه، نسبت به انتخاب آغازگرهای اختصاصی به وسیله نرم افزارهای Gene runner و Oligo analyzer برای ناحیه RT ویروس اقدام شد (جدول ۱).

استخراج RNA و ساخت cDNA:

۱۴۰ میکرولیتر از پلاسما جهت استخراج RNA ویروسی استفاده و بقیه در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد

نگهداری شد. استخراج ژنوم توسط کیت QIAamp Viral RNA Mini Kit شرکت کیاژن آلمان روی تمامی نمونه‌های دریافت شده انجام شد و پس از آن به عنوان الگو برای ساخت cDNA استفاده گردید.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده در مرحله اول و دوم

آغازگرهای مرحله اول	
Sense	5 AGTAGGACCTACACCTGTCAA 3
Antisense	5 TGTTAGTGCTTTGGTCCCCCT 3
آغازگرهای مرحله دوم	
Sense	5 ATGGCCCAAAGGTTAAACAATGG 3
Antisense	5 TTCTGTATATCATTGACAGTCCAG 3

از آنجایی که ویروس HIV، یک ویروس RNA دار می‌باشد، لذا پس از استخراج ژنوم، قبل از تکثیر می‌بایست RNA ژنومی این ویروس تبدیل به cDNA گردد (۱۶-۱۴). برای ساخت cDNA، ۴ میکرولیتر بافر آنزیم RT، ۰/۷۵ میکرولیتر آنزیم RT (M-MuLV)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RNasin، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر اختصاصی آنتی-سنس، ۲ میکرولیتر دی‌اکسی‌نوکلئوتید (dNTP)، ۵ میکرولیتر RNA DEPC Water و حجم نهایی با ۷/۲۵ میکرولیتر در تیوب‌های اپندورف استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط فوق با برنامه زمانی ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به دستگاه ترموسایکلر منتقل شد، سپس cDNA ساخته شده به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

RT-Nested PCR:

این روش یک راه سریع و قابل اعتماد جهت تایید محصول PCR است (۱۷). دور اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی 1X PCR بافر، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۳ میکرو لیتر از آغازگرهای (۱۲/۵ میکرو مولار) مرحله اول، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز و ۳/۵ میکرولیتر cDNA تحت برنامه زیر در دستگاه ترمو سايكلر (Master Cycler Gradient Eppendorf) انجام گرفت:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دناتورهیشن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و اکستنشن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه. سپس اکستنشن نهایی به مدت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در دور دوم PCR 1.2 X بافر، ۲/۲۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۳ میکرولیتر از آغازگرهای (۱۲/۵ میکرومولار) مرحله دوم، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA در حجم ۲۵ میکرولیتر با برنامه زمانی: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل: دناتورهیشن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، آنیلینگ در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و اکستنشن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه. سپس اکستنشن نهایی به مدت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، مورد استفاده قرار گرفت.

برای الکتروفورز نمودن محصولات PCR، از جریان الکتریسیته به میزان ۸۵-۸۰ ولت استفاده و پس از حدود ۴۵ دقیقه وجود قطعات مورد نظر با نور UV، به وسیله دستگاه فتوژل داکيومنت ارزیابی شد.

در ادامه برای راند دوم بر خلاف دفعات قبل که میزان محصول نهایی را ۲۵ میکرولیتر در نظر می‌گرفتیم، برای تعیین توالی میزان حجم نهایی محصول را ۱۰۰ میکرولیتر انتخاب و میزان مواد مصرفی را در این حجم محصول محاسبه نموده، PCR انجام شد.

برای استخراج قطعه از روی ژل، جهت تعیین توالی، ابتدا بر روی ژل آگارز ۱ درصد، تمام ۱۰۰ میکرولیتر از محصول به مدت ۴۰ دقیقه تحت ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و باندهای مورد نظر از ژل جدا گردید. قطعه بریده شده ژل به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده و پس از توزین و محاسبه وزن ژل داخل میکروتیوب، بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت بایونیر (Bioneer) انجام شد. جهت تایید فرآیند استخراج، میزان ۲ میکرولیتر از محلول فوق با شرایط قبلی روی ژل آگارز انجام شد. نمونه‌ها برای تعیین توالی در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، به همراه ۲۰ میکرولیتر آغازگرهای مرحله دوم، طبق درخواست شرکت، برای تعیین توالی ارسال گردید.

حاصل از مرحله دوم که در ناحیه RT قرار گرفته است، با توالی‌های متناظر از رفرنس‌های ژنومی موجود در بانک‌های ژن انجام گرفت (هر کدام از رفرنس‌ها حداقل در ۵ مقاله دیگر استفاده شده بودند). در این آنالیز ابتدا کلیه نتایج تعیین توالی ژن‌ها توسط برنامه Chromas و BioEdit مرتب گردید و سپس توسط برنامه متداول CLUSTAL W که خاص دسته‌بندی توالی‌ها (Alignment Multiple) می‌باشد، برای هم‌ردیف (align) نمودن این توالی‌ها و رسم یک درخت اولیه آزمایشی (pilot)، استفاده شد. فاصله ژنتیکی به وسیله ماتریکس Kimura-2-parameters تخمین زده شد و در نهایت درخت فیلوژنتیک به وسیله روش Maximum parsimony که متداولترین روش برای تشخیص همولوژی زیاد یا تفاوت کم ژنتیکی می‌باشد، توسط نرم‌افزار مگا ۴ رسم شد. برای ارزیابی صحت، با انجام ۱۰۰۰ بار bootstrap resampling، صحت درخت فیلوژنتیک ترسیم شده ارزیابی گردید (شکل ۱).

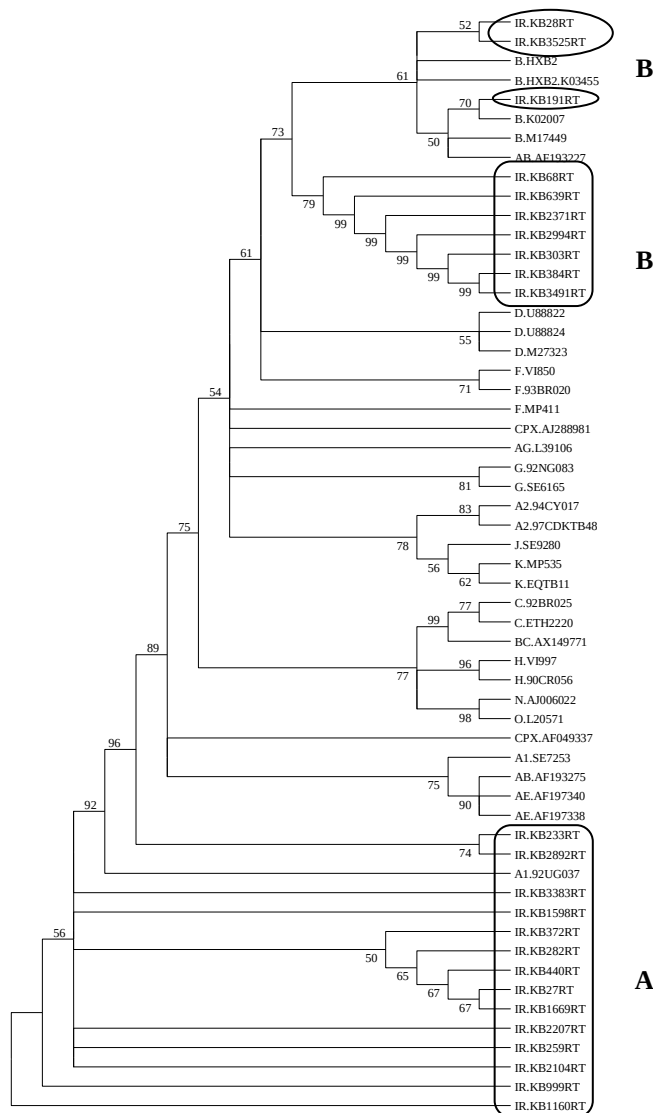
یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک ژن RT نشان می‌دهد که تحت گونه‌های موجود در ایران، A1 و B می‌باشد، در این پژوهش ۱۴ نمونه بیمار (۵۸/۳٪) تحت گونه A1 و ۱۰ نمونه دیگر (۴۱/۶٪) تحت گونه B بودند.

شیوع تحت گونه A1 در این مطالعه، در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی ۷۱/۴٪، در بیماران هموفیلی ۳۳/۳٪ و از طریق جنسی ۵۰٪ بود. شیوع تحت گونه B در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی ۲۸/۶٪، در بیماران هموفیلی ۶۶/۶٪، از طریق جنسی ۵۰٪ و در افراد هموفیلی این تحت گونه غالب بود (نمودار ۱). این نتایج اعلام شده بیانگر درصد میزان شیوع HIV در این گروه‌ها نمی‌باشد.

بحث

علت اهمیت هتروژنی HIV-1 از دو دیدگاه بررسی می‌شود، یکی بحث اپیدمیولوژیکی می‌باشد که باید نقشه ژنوم هر ناحیه سپس تحت گونه‌های آن مشخص شود (رسم درخت فیلوژنی) و دوم بحث کلینیکی آن است که باید موتاسیون‌های مقاومت دارویی را تشخیص داد (۱۸).



شکل ۱: نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک به روش ماکسیموم پارسیمونی در نمونه‌های تحت بررسی با bootstrap values ۱۰۰۰

تعیین توالی:

مراحل تعیین توالی در آزمایشگاه ویژه تعیین توالی (Gottingen GmbH SEQLAB) در کشور آلمان انجام گرفت. تعیین توالی با دستگاه خودکار تعیین توالی (ABI PRISM 3700 DNA analyzer automated sequencer Applied Biosystem, Foster city, CA, USA) صورت پذیرفت.

آنالیز فیلوژنتیک:

آنالیز فیلوژنتیک قطعه ۷۴۰ جفت بازی تکثیر یافته

نوترکیب CRF-AB را در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی، قزاقستان تحت گونه A را در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی و ترکیه تحت گونه‌های A، B، C، D و F را گزارش کرده‌اند (۲۴-۲۱).

برای آنالیز فیلوژنتیک، به طور معمول از نواحی ژنی env و gag استفاده می‌شود تا نوترکیبی‌ها را نیز تشخیص دهند. آنالیز فیلوژنتیک ژن pol نیز می‌تواند یک روش مناسب برای تعیین تحت گونه HIV باشد (۱۳-۱۱). با توجه به مطالعه‌های نادری و همکاران و صارمی و همکاران که روی نواحی ژنی env و gag انجام شده و سویه‌های نوترکیبی را گزارش نکرده‌اند، این آنالیز نیز بدون در نظر گرفتن احتمال وجود سویه‌های نوترکیب، وجود تحت گونه‌های A و B در نمونه‌های ایرانی را نشان داد (۲۶، ۲۵). قابل ذکر است که در مطالعه سهیلی و همکاران تحت گونه CRF35-AD نیز گزارش شده است (۲۷).

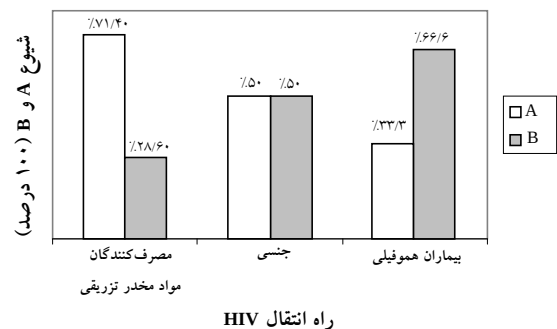
این نتایج بعضی از نکات اپیدمیولوژیکی را برای عفونت HIV-1 در ایران شرح می‌دهد. راه اصلی انتقال در ایران از طریق مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی است و تحت گونه A در ایران غالب می‌باشد. تنوع ژنتیکی HIV-1، یک چالش اصلی برای توسعه و ساخت یک واکسن مؤثر و درمان موفق می‌باشد (۲۲). این اطلاعات ممکن است برای استراتژی‌های برنامه‌ریزی و پیشگیری مفید باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه می‌تواند کاربرد مهمی برای جلوگیری و مدیریت کلینیکی عفونت HIV-1 در ایران داشته باشد. در نهایت با توجه به بحث موجود، پیشنهاد می‌شود که آنالیز فیلوژنی برای دیگر بیماران موجود در مراکز تحقیقاتی غیر از تهران انجام شود تا بتوان پراکندگی جغرافیایی و آب و هوایی در ایران را در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات ایدز ایران که در انجام این پژوهش حمایت علمی و مالی نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌گردد.



نمودار ۱: میزان شیوع تحت گونه‌های A و B بر اساس راه انتقال

تکامل در HIV-1 نه تنها بر اثر موتاسیون‌ها و نوترکیبی‌ها است بلکه بر اثر الگوهای آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی نیز می‌باشد. تحت گونه B در مدت زمان کوتاهی به صورت افقی در آمریکای شمالی و اروپا گسترش پیدا کرد، بر عکس تحت گونه A، گسترش جغرافیایی کمی داشته و بیشتر در آفریقا مانده است ولی نوترکیبی‌های داخل گونه‌ای در نوع A بیشتر از نوع B بوده و یا گروه O که بیشتر در آفریقا مانده است (۱۹). پیش‌بینی می‌شود در آینده فرم‌های نوترکیب O با بعضی از تحت گونه‌های گروه M مانند A و C به صورت اپیدمی درآیند (۲۰).

هدف در این پژوهش، بررسی سکانس ویروس HIV در گردش در ایران و بررسی تحت گونه‌ها با استفاده از آنالیز فیلوژنتیک بود.

جواب‌های حاصل از توالی‌یابی توسط Editseq و Bioedit ویرایش و با نرم‌افزار مگا ۴ به همراه توالی‌های مرجع موجود در بانک ژنی NCBI، توافقی ترادفی انجام شد. به دلیل این که ناحیه RT بین تحت گونه‌ها همولوژی یا شباهت زیادی دارد، از روش ماکسیموم پارسیمونی که قدرت تشخیص حداقل تفاوت را دارد برای رسم درخت فیلوژنتیک استفاده شد.

آنالیز فیلوژنتیک و تعیین تحت گونه‌ها در ایران، تحت گونه A را در مصرف‌کنندگان موارد مخدر تزریقی و تحت گونه B را در افراد هموفیلی نشان داد. برخی از کشورهای همسایه مانند پاکستان، تحت گونه A را در مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی، ازبکستان تحت گونه A و فرم

References :

- 1- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, *et al.* Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-111. *Nature* 1985; 313(6000): 277-84.
- 2- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985; 40(1): 9-17.
- 3- McCutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000; 14 Suppl 3: S31-44.
- 4- Kosiol C, Bofkin L, Whelan S. Phylogenetics by likelihood: Evolutionary modeling as a tool for understanding the genome. *J Biomed Inform* 2006; 39(1): 51-61.
- 5- Corbet S, Müller-Trutwin MC, Versmissen P, Delarue S, Ayoub A, Lewis J, *et al.* env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol* 2000; 74(1): 529-34.
- 6- Peeters M. Recombinant HIV sequences: Their role in the global epidemic. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory; 2000. p.139-54.
- 7- HJ Fleury. Genomic variability of HIV-1 and resistance to antiretroviral drugs. Iran, IBTO. (2007) Presentation.
- 8- Korber B, Hoelscher M. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. *AIDS* 1997; 11(15): 17-36.
- 9- UNAIDS/WHO. Report on the global HIV/AIDS epidemic. December 2007. UNAIDS/WHO, Geneva, Switzerland. Available from: http://data.unaids.org/pub/epislides/2007/2007_epiupdate_en.pdf
- 10- UNAIDS/WHO. Report on the global HIV/AIDS epidemic. Islamic Republic of Iran. December 2006. Available from: <http://msmgf.org/documents/Asia/HIVandAIDS/WHO/CountryProfile/Iran.pdf>
- 11- Pasquier C, Millot N, Njoum R, Sandres K, Cazabat M, Puel J, *et al.* HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *J Virol Methods* 2001; 94(1-2): 45-54.
- 12- Njoum R, Pasquier C, Sandres-Sauné K, Harter A, Souyris C, Izopet J. Assessment of HIV-1 subtyping for Cameroon strains using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *J Virol Methods* 2003; 110(1): 1-8.
- 13- Plantier JC, Dachraoui R, Lemée V, Gueudin M, Borsa-Lebas F, Caron F, *et al.* HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots. *AIDS* 2005; 19(4): 391-7.
- 14- Colonna-Romano S, Leone A, Maresca B. Differential- display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR). Berlin: Springer; 1998.
- 15- Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, *et al.* Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis virus, hepatitis C virus RNA and human Immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2937-45.
- 16- Albert J, Fenyo EM. Simple sensitive and specific detection of Human Immunodeficiency virus type 1 in clinical specimen by polymerase chain reaction with PCR. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7): 1560-4.
- 17- Bartlett JMS, Stirling D. PCR Protocols: Nested PCR. Human Press; 2003. p. 151-9.
- 18- Silva WP, Santos DE, Leal E, Brunstein A, Sucupira MC, Sabino EC. Reactivation of ancestral strains of HIV-1 in the gp120 V3 env region in patients failing antiretroviral therapy and subjected to structured treatment interruption. *Virology* 2002; 302(2): 259-73.
- 19- Lamei Ch. Global analysis of drug resistance and viral fitness mutations and their evolutionary dynamics in HIV-1; 2005. Available from: <http://proquest.umi.com/pqdlink?did=990280271&Fmt=7&clientId=79636&RQT=309&VName=PQD>.
- 20- Roques P, Robertson DL, Souquière S, Damond F, Ayoub A, Farfara I, *et al.* Phylogenetic Analysis of 49 Newly Derived HIV-1 Group O Strains: High Viral Diversity but No Group M-like Subtype Structure. *Virology* 2002; 302(2): 259-73.
- 21- Khan S, Rai MA, Khanani MR, Khan MN, Ali SH. HIV-1 subtype A infection in a community of intravenous drug users in Pakistan. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 164.
- 22- Kurbanov F, Kondo M, Tanaka Y, Zhalaliev M, Giasova G, Shima T, *et al.* Human immunodeficiency virus in Uzbekistan: epidemiological and genetic analyses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19(9): 731-8.
- 23- Bobkov AF, Kazennova EV, Sukhanova AL, Bobkova MR, Pokrovsky VV, Zeman VV, *et al.* An HIV type 1 sub type A outbreak among injecting drug users in Kazakhstan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20(10): 1134-6.
- 24- Yilmaz G, Midilli K, Türkoğlu S, Bayraktaroğlu Z, Kuşkucu AM, Ozkan E, *et al.* Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. *Int J Infect Dis* 2006; 10(4): 286-90.
- 25- Naderi HR, Tagliamonte M, Tornesello ML, Ciccozzi M, Rezza G, Farid R, *et al.* Molecular and phylogenetic analysis of HIV-1 variants circulating among injecting drug users in Mashhad-Iran. *Infect Agent Cancer* 2006; 1: 4.
- 26- Sarraimi-Forooshani R, Das SR, Sabahi F, Adeli A, Esmaeili R, Wahren B, *et al.* Molecular Analysis and Phylogenetic Characterization of HIV in Iran. *J Med Virol* 2006; 78(7): 853-63.
- 27- Soheili ZS, Ataiee Z, Tootian S, Zadsar M, Amini S, Abadi K, *et al.* Presence of HIV-1 CRF35-AD in Iran. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25(1): 123-4.

Original Article

Phylogenetic analysis of HIV-1 pol gene (RT sequences) among Iranian HIV infected patients

Baesi K.¹, Ravanshad M.¹, Hosseini S.Y.¹, Haji Abdolbaghi M.², Shahzamani K.³

¹Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²AIDS Research Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Digestive Diseases Research Center, Shariati Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human immunodeficiency virus (HIV) is the retrovirus that causes the disease known as AIDS. In the current study, we examined the genetic diversity of HIV-1 strains circulating in Iran.

Materials and Methods

Sequencing and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pol gene is a useful method for subtyping strains of HIV-1. HIV-1 RNA was derived from plasma of 24 infected patients in Imam Khomeini Hospital in Tehran. RT Nested-PCR was developed and the product was extracted from agarose gel. The products were sequenced and phylogenetic analysis by Mega 4 software was constructed.

Results

The developed PCR method successfully amplified the specific sequence. The sequence and phylogenetic analysis showed subtypes A1 and B in 14 and 10 patients, respectively.

Conclusions

The results indicated intravenous drug users infected with HIV-1 subtype A1, and hemophiliacs infected with HIV-1 subtype B. The results also showed that the subtype A1 is the most prevalent in HIV infected patients. Such information can be useful in intervention strategies and control programs.

Key words: HIV-1, Iran, Genetic Diversity

Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(2): 94-100

Received: 3 Nov 2008

Accepted: 16 Mar 2009

Correspondence: Ravanshad M., PhD of Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.

P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883836; Fax: (+9821) 88013030

E-mail: ravanshad@modares.ac.ir