خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۲ تابستان ۸۹ (۱۰۰-۹۴)

مقاله پژوهشی

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 مگا۴ 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.

نتیجه گیری

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 ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤلف مسؤول: PhD ویروس شناسی ـ استادیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس- صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD بیماری‌های عفونی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ مرکز تحقیقات ایدز بیمارستان امام خمینی
۴- PhD ویروس شناسی ـ استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]

مقدمه

ویروس HIV یکی از اعضای خانواده رتروویریده می‌باشد. 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 می‌شود(۲، ۱).

ویروس HIV دارای تغییرات ژنتیکی بسیار بالایی است که در نتیجه خطای آنزیم RT می‌باشد و بدون فعالیت تصحیح، انجام می‌شود(۳).

فیلوژنتیک، فرآیندی از بازسازی ارتباط تکاملی ممکن و محتمل از سکانس‌های نوکلئوتیدی غیر متغیری است که منعکس‌کننده شباهت‌های ژنتیکی و ارتباط تکاملی می‌باشند و به عنوان زمان‌سنج‌های مولکولی عمل می‌نمایند. مواردی از کاربردهای فیلوژنتیک، ترسیم ارتباط فیلوژنی ارگانیسم‌ها و مارکرها و امکان ارایه آن به بیننده در یک نگاه، تخمین زمان شاخه شاخه شدن، بازسازی پروتئین‌های قدیمی، تشخیص نقاط نوترکیبی(روش جدید Bayesian نوترکیبی HIV را تشخیص می‌دهد)، ترسیم ارتباط اجدادی، تشخیص پاتوژن‌های جدید، مشاهده اپیدمیولوژیکی و آنالیز تغییرات در گونه‌های ویروسی می‌باشد(۴).

تحلیل فیلوژنتیکی این ویروس در سراسر جهان سه گروه ژنتیکی M ، O و N را نشان می‌دهد. گروه M به ۸ تحت تیپ (A-J) تقسیم می‌شود که حدوداً ۹۵ درصد سوش‌های HIV-1 را به خود اختصاص داده است. زیر گروه B شایع‌ترین زیر گروه ویروسی در اروپا می‌باشد(۶، ۵). تحت تیپ‌های A و G در غرب آفریقا و تحت تیپ C در آفریقای جنوبی غالب می‌باشند. در هندوستان و در کشورهای جنوب شرقی آسیا، تحت تیپ‌های C، B و E غالب هستند(۸، ۷).

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 مصرف‌کنندگان مواد مخدر تزریقی حدود ۶۹/۹ درصد می‌باشد. 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 شده‌اند. بر اساس گزارش‌ها، حدود ۱۶۰۰۰۰–۳۶۰۰۰ با میانگین ۶۶۰۰۰ نفر در ایران به HIV آلوده هستند و تا سال ۲۰۰۷، به طور متوسط ۱۷۶۰ نفر به علت ایدز از بین رفته‌اند(۱۰، ۹). در این پژوهش، هدف بررسی سویه‌های ویروس HIV-1 موجود در ایران بود. آنالیز فیلوژنتیک ژن pol نیز می‌تواند یک روش مناسب برای تعیین تحت گونه HIV باشد(۱۳–۱۱).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

نمونه‌گیری و شرایط نگهداری نمونه:

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

حدود ۷ سی‌سی خون محیطی بیماران مبتلا به ایدز، در لوله‌های استریل دارای ماده ضد انعقاد(EDTA با غلظت ۱ mg/ml) ریخته شد. سپس برای جداسازی پلاسما، لوله‌ها با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه(rpm) سانتریفوژ و در نهایت با استفاده از سمپلر، پلاسما به درون لوله‌های اپندورف استریل منتقل گردید. کلیه نمونه‌ها بعد از تهیه شدن در فریزر ۷۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در ابتدا تعداد زیادی ژنوتیپ‌های مختلف HIV-1 و سکانس‌های مربوطه، از بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnical Information) جمع‌آوری گردید و با استفاده از هم ردیف‌سازی چند گانه(multiple alignment) و بهره‌گیری از نرم‌افزارهای Alignment software برای دسته‌بندی چندگانه و مقایسه، نسبت به انتخاب آغازگرهای اختصاصی به وسیله نرم‌افزارهای 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 سانتی‌گراد

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]

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 TGTTAGTGCTTTGGTTCCCCT 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 آنتی‌سنس، ۲ میکرولیتر دی‌اکسی‌نوکلئوتید(dNTP)، ۵ میکرولیتر RNA ویروسی و حجم نهایی با ۷/۲۵ میکرولیتر DEPC Water 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 سایکلر (Master Cycler Gradiant Eppendorf) انجام گرفت:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دناچوریشن 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.

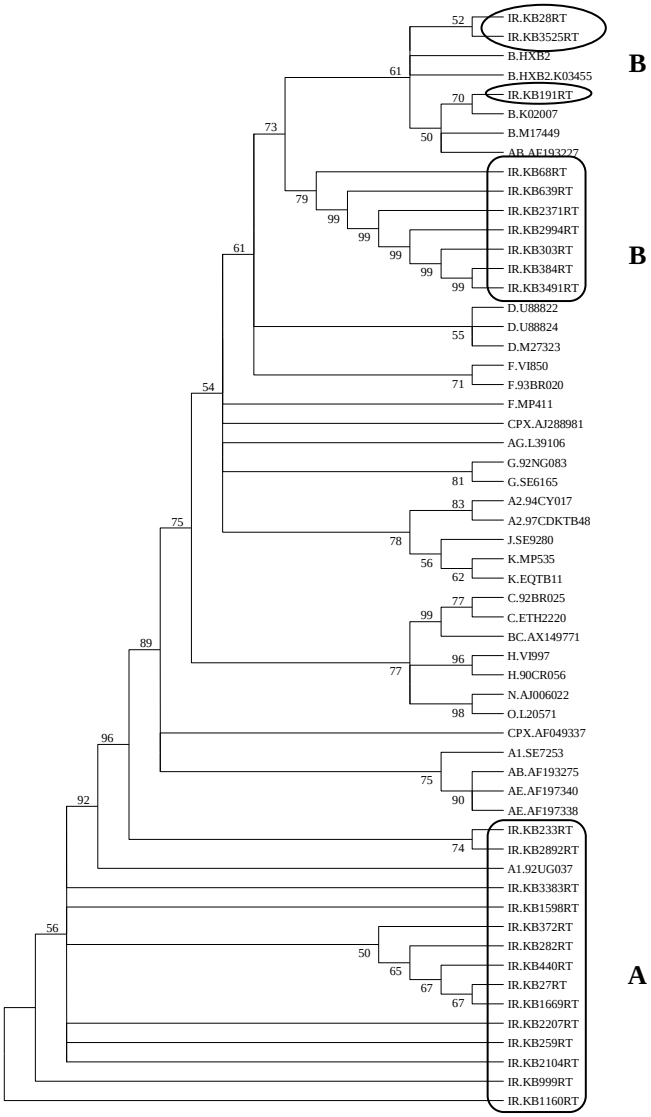
در دور دوم 1.2 X PCR بافر، ۲/۲۵میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۳ میکرولیتر از آغازگرهای(۱۲/۵ میکرومولار) مرحله دوم، ۱ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA در حجم ۲۵ میکرولیتر با برنامه زمانی: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل: دناچوریشن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 داکیومنت 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 میلی‌لیتری 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]



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 PRISMR 3700 DNA analyzer automated sequencer Applied Biosystem , Foster city , CA,USA) صورت پذیرفت.

آنالیز فیلوژنتیک:

آنالیز فیلوژنتیک قطعه ۷۴۰ جفت بازی تکثیر یافته 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 رفرانس‌ها 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).

یافته ها

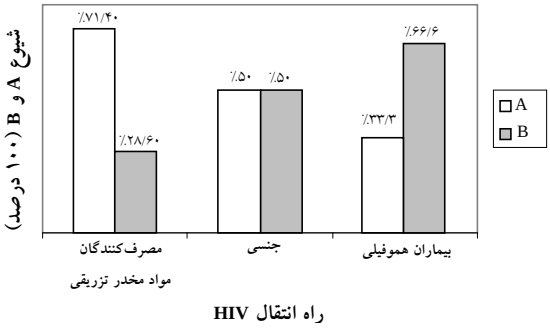
نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیک ژن RT نشان می‌دهد که تحت گونه‌های موجود در ایران، A1 و B می‌باشد، در این پژوهش ۱۴ نمونه بیمار(۵۸/۳٪) تحت گونه A1 و ۱۰ نمونه دیگر(۴۱/۶٪) تحت گونه B بودند.

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).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]



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 مگا۴ به همراه توالی‌های مرجع موجود در بانک ژنی NCBI، توافق ترادفی انجام شد. به دلیل این که ناحیه RT بین تحت گونه‌ها هومولوژی 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 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

بدین‌وسیله 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]

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, Versmisse P, Delarue S, Ayouba 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, switzerand. 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, Njouom 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- Njouom 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, Ayouba A, Farfara I, *et al*. Phylogenetic Analysis of 49 Newly Derived HIV-1 Group OStrains: 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, Zalalieva 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- Sarrami-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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]

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]

[1]Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]AIDS Research Center, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Digestive 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-09-04]