

Phylogenetic Molecular Analysis Human Immunodeficiency Virus (HIV) Patients in Surabaya, East Java

Nasronudin,*,**** Maria Inge Lusida,**,**** Retno Handajani,***,****
Lindawati,**,**** Ferry Efendi,**** Takako Utsumi*****

*Department of Internal Medicine Faculty of Medicine Airlangga University, Surabaya

**Department of Microbiology Faculty of Medicine Airlangga University, Surabaya

***Department of Biochemistry Faculty of Medicine Airlangga University, Surabaya

****Faculty of Nursery Faculty of Medicine Airlangga University, Surabaya

*****Institute of Tropical Disease Airlangga University

*****Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, Japan

Abstract: The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) isolates are classified in three main groups: **group M** (main), **group O** (outlier) as well as **group N** (non-M/non-O). The HIV-1 M group, responsible for the majority of infections in the HIV-1 worldwide epidemic, can be further subdivided into 10 recognized phylogenetic subtypes or clades, A–D and F–K. HIV-1 phylogenetic classifications are currently based on nucleotide sequences derived from such as **gag p17** region of the same isolates or on full-length genome sequence analysis. We do not know HIV subtype distribution in HIV suspected patients, in Surabaya, East Java. **The aims** of this study was to do molecular analysis HIV in patients with HIV infection, in Surabaya, East Java. Antibody to HIV were detected using 3 methods, paper and EIA (Acon) and ELISA (Axion) techniques from 51 plasma obtained from the patients suspected HIV infection, in Surabaya, Indonesia All of the samples were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) using pairs of primers based on HIV gag p17 genes. The PCR positive samples were sequenced and analysed to identify the HIV subtype using Genetic Version 9 program. Forty nine (96,08%) HIV antibody were detected from 51 patients suspected HIV infection and 57,14% (28/49) HIV RNA determination positives. All of 21 positives HIV DNA except one sample that have been analyzed was CRFs of HIV with majority CRF01-AE subtype similar with HIV CRF01-AE subtype in Asia countries, e.g. Thailand, Japan, Malaysia, Cina and Hongkong. Those one sample has 18 nucleotides insertion look like a HIV new subtype but it is needed to confirm further. From **gag p7** HIV gene in this study, one HIV has and CRF01-AE is majority HIV subtype in Surabaya, East Java which is located in the same branch with HIV common CRF01-AEHIV subtype in Asia.

Key words: HIV subtype, gag p17 gene, Surabaya, Indonesia

Pendahuluan

Phylogenetic merupakan studi evolusi yang berhubungan dengan berbagai kelompok organisme (spesies, populasi) yang ditemukan melalui data sekuensing molekuler dan data matrik morfologi. Istilah *phylogenetics* berasal dari Yunani dari istilah *phyle/phylon* yang berarti suku/ras dan *genetikos* yang berarti “berhubungan dengan kelahiran”.¹ Bidang ini tumpang tindih dengan ilmu sistematik *phylogenetic* atau *cladism*, dimana hanya pohon *phylogenetic* yang digunakan untuk membatasi takson, dan masing-masing menggambarkan kelompok yang diwarisi mempunyai hubungan dengan individu.

Pendekatan yang paling sering digunakan adalah perbandingan urutan gen menggunakan teknik *sequence*

alignment untuk mengidentifikasi kesamaan. Aplikasi lainnya dari molekuler *phylogeny* adalah *DNA barcoding*, dimana spesies dari organisme individu diidentifikasi menggunakan bagian kecil mitokondria DNA. Aplikasi lainnya dari teknik pemeriksaan genetik untuk menentukan paternitas anak dan juga pada kasus *forensic criminal* yang dikenal sebagai sidik jari genetik.²

Dengan pertimbangan bahwa sampai saat ini belum pernah dilakukan analisis molekuler *phylogenetic Human Immunodeficiency Virus (HIV)* pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya, Jawa Timur, maka dirasakan perlu dilakukan penelitian analisis molekuler *phylogenetic HIV* pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya, Jawa Timur.

Metode Penelitian

Sampel Darah

Penelitian ini merupakan *Cross sectional study*. Lima puluh satu (51) sampel darah di *Institute of Tropical Disease* yang berasal dari pasien yang dicurigai menderita HIV periode 2009. Pada sampel darah akan dilakukan pemeriksaan antibodi terhadap HIV dengan metoda, yaitu: strip test, EIA dan *ELISA test*, dan pemeriksaan PCR terhadap RNA HIV. Hasil PCR HIV yang positif akan disekuensing untuk penelitian "Analisis molekuler *phylogenetic* HIV pada penderita yang terinfeksi HIV di Surabaya Jawa Timur".

Plasma darah yang digunakan adalah sisa pemeriksaan rutin, yang saat pengambilan darah ditempatkan dalam tabung pemusing steril dengan anti-koagulan, kemudian dilakukan pemusingan untuk mendapatkan plasmanya. Plasma yang telah dipisah, dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80°C sampai saat pemeriksaan anti-HIV dan RNA HIV dilakukan.

Pemeriksaan Laboratorium

1. Pemeriksaan Anti-HIV

Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan anti-HIV dalam plasma darah penderita tersebut. Pemeriksaan antibodi menggunakan *Tri-line HIV Rapid test Device* dari *Acon*, dan untuk HIV 1/2/O berupa strip, *Foresign HIV 1/2/O Antibody EIA Test Kit* dari *Acon* serta *Anti-HIV 1+2/Subtype O ELISA* dari *Axiom*.

2. Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR) HIV

Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan PCR HIV untuk mendeteksi cDNA HIV, dengan tahapan: ekstraksi RNA HIV dari serum dan sintesis cDNA HIV, reaksi amplifikasi dengan PCR, elektroforesis agar, dan pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis.

2.1 Ekstraksi RNA HIV dari serum dan sintesis cDNA HIV

Ekstraksi RNA HIV ditujukan pada daerah genom HIV : *gag p17*. RNA HIV diekstraksi dari serum dengan metoda ekstraksi menggunakan reagen *One Step Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR) Test (Invitrogen)* sesuai petunjuk pada kit. Apabila sampai saat deteksi hasil PCR dengan elektroforesis diperoleh hasil yang masih negatif, maka ekstraksi RNA HIV diulang menggunakan RNAzol sesuai petunjuk pada kit yang dilanjutkan, menggunakan *primer antisense* tersebut di atas.

2.2 Reaksi amplifikasi dengan PCR

Pada reaksi *One Step PCR* digunakan pasangan *primer*: JA-152 5' - ATCTCTAGC AGT GGC GCC CGAACAG - 3' dan JA - 155 5' - CTG ATA ATG CTG AAAACATGG GTAT - 3' yang apabila diperoleh hasil yang negatif, dilanjutkan dengan *second round PCR* HIV menggunakan pasangan *primer Invitrogen*, yaitu: JA-153 5' - CTC TCG ACG CAG

GACTCGGCTTGCT - 3' dan JA-154 5' - CCCATGCAT'TCA AAG TTCTAG GTGA - 3'.^{3,6} Demikian juga ulangan ekstraksi PCR, digunakan *primer* yang sama. Ulangan PCR ini juga ditujukan pada daerah genom HIV: *gag p17* dan dilakukan sebagai upaya menjangkir hasil positif yang lebih banyak.

Primer lain yang digunakan dalam upaya menjangkir kepositifan pemeriksaan PCR RNA HIV yang lebih banyak adalah *primer* dan *Invitrogen*: JA-114: 5'-TCT CTT CTA CTA CTTTACCCATG C-3', JA-115: 5'-GGC TCC TTCTGATAA TGCTGAAAA C-3' dan JA-117: 5'-GCATTTAAAGTT CTA GTT CTA GT/GT GA-3'.³

Untuk reaksi amplifikasi pada PCR HIV ini juga digunakan Kit PCR *mixed Fermentas* untuk pemeriksaan *second round PCR* dan pada PCR I apabila ekstraksi RNA HIV menggunakan *Fermentas*. PCR (1 tahap maupun 2 tahap) masing-masing dikerjakan sebanyak 40 siklus dan digunakan suhu pendahuluan 94°C selama 5 menit, kemudian untuk masing-masing siklus: 94°C untuk denaturasi selama 1 menit, 60°C untuk *annealing* selama 1 menit, dan 72°C untuk ekstensi selama 3 menit. Untuk keperluan PCR ini digunakan *primer* daerah genom *gag p17* HIV tersebut di atas dapat digunakan untuk pemeriksaan *phylogenetic* HIV.⁵

2.3 Elektroforesis agar

Pada hasil amplifikasi DNA VHB dilakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa 2% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang mengandung ethidium bromide. cDNA HIV dari sampel-sampel, kontrol negatif (digunakan akuades), kontrol positif serta marka (Φ x174/Hae III digest) yang sudah diseparasi dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet.

2.4 Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis

Untuk dokumentasi hasil, dilakukan pengambilan foto dengan menggunakan kamera digital.

3. Sekuensing

Pada hasil PCR yang positif, selanjutnya dilakukan sekuensing dengan tahapan: purifikasi DNA HIV hasil PCR, elektroforesis agar hasil purifikasi DNA, purifikasi DNA HIV dari *low melting* agarosa, *labeling* DNA murni dengan PCR prosequensing, purifikasi DNA hasil PCR *labeling* prosequensing, elektroforesis dengan mesin Sequencer ABI 310, sebagai berikut:

3.1 Purifikasi DNA HIV hasil PCR

Purifikasi DNA HIV hasil PCR dilakukan dengan *QIAquick-spin PCR purification kit* dari *Qiagene* atau dengan metode *phenol-chloroform purification* dan setelah diperoleh DNA HIV murni diaplikasikan pada *low melting agarose*.

3.2 Elektroforesis agar hasil purifikasi DNA

Pada semua DNA HIV murni hasil PCR yang positif dari sampel dilakukan elektroforesis dengan diaplikasikan pada agarose *low melting* 2% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang

mengandung *ethidium bromide*. DNA HIV dari sampel-sampel (tanpa kontrol positif dan negatif) yang dielektroforesis dan sudah dipisahkan dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet *long wave*. Tahap ini dilakukan untuk melihat keberhasilan proses purifikasi.

3.3 Purifikasi DNA HIV dari *low melting agarosa*

Selanjutnya, *band* yang dikehendaki dipotong dari *agarosa low melting* dilakukan purifikasi DNA lagi dengan menggunakan *QIAquick Gel Extraction kit* dari *Qiagen*, sesuai dengan prosedur yang terlampir pada kit.

3.4 Labelling DNA murni dengan PCR prosekuensing

Hasil purifikasi DNA menggunakan *QIAquick Gel Extraction kit* dari *Qiagen*, dilakukan PCR prosekuensing (untuk *labeling*) menggunakan salah satu primer yang dipakai dalam PCR sebelumnya. Pada tahap ini dilakukan *labeling* dengan *dye dideoxy* nukleotida trifosfat yang sudah dilabel, yaitu menggunakan *Bigdye Termination Kit V1.1* dari *Applied Biosystem*.

3.5 Purifikasi DNA hasil PCR labeling prosekuensing

Purifikasi DNA dari PCR *labeling* prosekuensing dilakukan dengan proses presipitasi menggunakan etanol dan sodium asetat. Selanjutnya DNA kering disimpan sampai saatnya diaplikasikan pada mesin sequencer setelah dicampur dengan reagen-reagen sekuensing dari *Applied Biosystem*.

3.6 Elektroforesis dengan mesin Sequencer ABI 310

Pada hasil PCR *labeling prosekuensing* yang sudah dimurnikan, berisi fragmen-fragmen nukleotida yang telah diamplifikasikan dari daerah genom HIV yang dituju. Selanjutnya dilakukan analisis sekuens nukleotida dengan metode *direct sequencing* dengan diaplikasikan pada mesin *ABI 310 sequencer DNA* dari *Applied Biosystems, Inc*.

Pada proses ini melibatkan penggunaan *capiller buffer with Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA), HiDi formamide*, tabung untuk sekuensing 0,5 ml dengan septa, dari *Applied Biosystems, Inc*.

Analisis Phylogenetic Hasil Sequencing

Selanjutnya dilakukan analisis molekuler nukleotida hasil sekuensing DNA HIV yang diperoleh dari serum sampel penderita, dan dibandingkan dengan sekuens nukleotida dari genotipe HIV yang pernah dipublikasi sebelumnya, dengan program *Genetyx Ver.9* menggunakan komputer. Tujuannya untuk mengetahui urutan nukleotida/variasi dari genotipe VHB pada penderita tersebut.

Lokasi Penelitian

Pelaksanaan pemeriksaan laboratorium dari sisi molekuler semua dilaksanakan di laboratorium HIV, *Institute of Tropical Disease (ITD)*, Universitas Airlangga, sedangkan

untuk pemeriksaan serologi, dilakukan di laboratorium swasta.

Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan 51 sampel sera yang berasal dari pasien dengan *suspect* terinfeksi *Human Acquired Immunodeficiency Virus (HIV)* yang berobat di praktek dokter swasta dan memeriksakan darahnya di laboratorium di ITD.

Tabel 1. Jenis Kelamin dan Umur Sampel Penderita

Jenis Kelamin	Jumlah Penderita (%)	Rerata dan Kisaran Umur (Tahun)
Pria	35 (68,63%)	33,5 (23-53)
Wanita	16 (31,37%)	32,3 (24-56)
Total	51 (100%)	32,9 (23-56)

Untuk mengetahui genotip HIV, urutan nukleotida yang didapat pada penelitian ini dibandingkan dengan urutan nukleotida yang sudah dipublikasi. Hasil selengkapnya sampel dengan antibodi dan PCR yang positif dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Amplifikasi PCR HIV pada Penderita Suspect HIV

	Antibodi HIV	PCR HIV
Positif	49/51 (96,08%)	28/49 (57,14%)
Negatif	2/51 (3,92%)	0/2 (0%)
Total	51/51 (100%)	28/51 (54,90%)

Hasil, antibodi terhadap HIV terdeteksi pada 96,08% (49/51) penderita *suspect* HIV dan RNA HIV terdeteksi pada 57,14% (28/49). Pada analisis selanjutnya dari 21 nukleotida gen *gag p17 HIV* yang dianalisis, semua adalah CRF, terutama HIV subtipe CRF01-AE yang menempati satu cabang dengan HIV CRF01-AE yang berasal dari Asia, yaitu Thailand, Jepang, Malaysia, Cina dan Hongkong, kecuali satu sampel. Satu sampel tersebut mempunyai insersi 18 nukleotida nampaknya seperti subtipe HIV yang baru.

Diskusi

Lima puluh satu pasien dengan *suspect* terinfeksi HIV ini di RSU Dr. Soetomo dalam penelitian ini rerata umurnya 32,9 tahun dan kisaran umur 23 sampai dengan 56 tahun. Pasien dengan *suspect* terinfeksi HIV terdiri dari 35 orang laki-laki dengan rerata umur 32,9 tahun dan kisaran umur 23 tahun sampai dengan 53 tahun serta 16 orang perempuan dengan rerata umur 32,9 tahun dan kisaran umur 24 tahun sampai dengan 56 tahun. Rangkuman data jenis kelamin dan umur penderita dengan *suspect* terinfeksi HIV ditampilkan pada Tabel 1.

Pada 51 plasma pasien tersebut semua diperiksa antibodi terhadap HIV, yaitu dengan pemeriksaan antibodi menggunakan *Tri-line HIV Rapid Test Device* dari Acon untuk HIV 1/2/O berupa strip, *Foresight HIV 1/2/O Antibody EIA Test Kit* dari Acon serta Anti-HIV 1+2/*Subtype O ELISA* dari Axion. Penggunaan ketiga macam pemeriksaan untuk antibodi terhadap HIV ini dimaksudkan untuk menghindari kesalahan dalam pembuatan diagnosis. Hal ini dilakukan karena diagnosis terinfeksi HIV merupakan diagnosis yang berdampak sangat luas, tidak hanya terhadap pasien, namun juga terhadap lingkungan sekitarnya maupun upaya pengendalian yang dilakukan pemerintah.

Hasil pemeriksaan antibodi terhadap HIV pada 51 plasma penderita tersebut didapatkan 2 plasma penderita memberikan hasil pemeriksaan antibodi yang negatif dan 48 serum penderita memberikan hasil yang positif terhadap ketiga macam pemeriksaan antibodi terhadap HIV. Pada hasil pemeriksaan antibodi terhadap HIV yang positif maupun negatif ini dilakukan PCR untuk daerah gen *gag* HIV.

Deteksi asam nukleat HIV dengan PCR merupakan metoda pilihan untuk diagnosis infeksi HIV pada keadaan deteksi antibodi masih memberikan hasil negatif.⁷ Pada pemeriksaan PCR dalam penelitian ini, digunakan pasangan-primer yang telah digunakan dan dipublikasikan dalam jurnal internasional.^{4,6} Dari 51 sampel tersebut, pada pemeriksaan PCR dari gen *gag* p71 HIV didapatkan hasil pemeriksaan PCR positif pada 28 sampel yang semuanya berasal dari sampel dengan antibodi positif. Pada sampel dengan pemeriksaan antibodi terhadap HIV positif dan pemeriksaan PCR HIV positif pada penderita tersebut masih mengandung RNA HIV, sehingga masih mempunyai potensi untuk menularkan virus HIV. Pada sampel yang negatif pada penggunaan pasangan primer dalam penelitian ini kemungkinan terjadi perubahan/mutasi urutan nukleotida pada tempat melekat/*annealing primer*, sehingga primer tidak dapat melekat/*annealing* yang berakibat hasil PCR negatif. Pasangan primer dalam penelitian ini merupakan pasangan primer yang apabila dipakai PCR dan dapat memberikan amplifikasi nukleotida yang positif, maka setelah dilakukan *sekuensing*, urutan nukleotida yang didapat digunakan untuk mengetahui genotip HIV.

DNA HIV hasil amplifikasi PCR selanjutnya dimurnikan dan dilakukan *sekuensing* dengan menggunakan mesin *sequencer* ABI-310. Dari hasil *sekuensing* yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis molekuler untuk mengetahui genotip HIV dan homologi urutan nukleotida yang didapat. Untuk mengetahui genotipe HIV, urutan nukleotida hasil *sekuensing* yang diperoleh dalam penelitian ini dibandingkan dengan urutan nukleotida VHB genotipe lain yang telah dipublikasi.⁸⁻¹¹ Kemudian dianalisis dan dibuat pohon *phylogenetic*. Urutan nukleotida hasil *sekuensing* yang diperoleh dari sampel pasien *suspect* HIV ini akan dipakai untuk mengetahui adanya variasi genetik ataupun mutasi pada DNA hasil PCR dalam penelitian ini.

Telah dikemukakan bahwa identifikasi HIV-1 yang berbeda dalam env menyebabkan HIV dikelompokkan menjadi: M, N dan O. Kelompok M adalah yang paling sering dijumpai dan terbagi menjadi 9 sub tipe/*clade* berdasarkan keseluruhan genom yang secara geografis berbeda, yaitu sub tipe A, B, C, D, F, G, H, J dan K.⁸⁻¹¹ Sub tipe HIV ini selanjutnya dibagi lagi menjadi subsub tipe, yaitu antara lain A1, A2, F1 dan F2.⁹ Dikemukakan bahwa sub tipe HIV yang berbeda dapat berbeda pula pada efek transmisi (penularannya), timbulnya resistensi obat, maupun perogresifitas penyakit.¹⁰ Variasi genetik antar sub tipe HIV-1 pada gen *gag* berkisar 20% menurut Tebit,¹² dan menurut Ndembu 2009 berkisar 25-35% dan didalam sub tipe berkisar 15-20%.¹⁰

Telah dikemukakan pula bahwa prevalen terbanyak adalah sub tipe B (ditemukan terutama di Amerika Utara dan Eropa), A dan D (Afrika), C (Afrika dan Asia). Sub tipe tersebut membentuk cabang dalam pohon genetik yang menggambarkan keturunan dari kelompok M dari HIV-1. Koinfeksi dengan sub tipe yang berbeda menyebabkan peningkatan *circulating recombinant forms* (CRFs). Pada tahun 2000, dibuat analisis global sub tipe prevalen, yaitu: 47,2% infeksi di seluruh dunia adalah sub tipe C, 26,7% adalah sub tipe A/CRF02-AG, 12,3% adalah sub tipe B, 5,3% adalah sub tipe D, 3,2% adalah CRF-AE, dan sisanya 5,3% terdiri dari sub tipe lain dan CRFs.¹³ Sebagian besar penelitian HIV-1 berfokus pada sub tipe B, sedangkan sedikit yang lainnya berfokus pada sub tipe lain.¹⁴

Kesimpulan

Dari penelitian ini berdasar urutan nukleotida daerah *gag* p17, dapat disimpulkan: HIV di Surabaya, Jawa Timur sebagian besar terdapat dalam satu kelompok dengan kelompok *Circulating Recombinant Forms* dan terutama adalah *CRF01-AE* yang juga terdapat di berbagai negara di Asia. Satu sampel HIV mempunyai insersi 18 nukleotida yang masih perlu diteliti lebih lanjut apakah memang merupakan sub tipe HIV yang baru.

Daftar Pustaka

1. Edwards AWF, Cavalli-Sforza LI. *Phylogenetics is that Branch of Life Science, Which Deals with the Study of Evolutionary Relation Among Various Groups of Organisms, Through Molecular Sequencing Data*. Systematics Assoc. Publ. No. 6: Phenetic and Phylogenetic Classification. Ed. Reconstruction of Evolutionary Trees. 1964.p.67-76.
2. HIV and Phylogenetic. Dalam www.en.wikipedia.com (Akses tanggal 23 Januari 2009).
3. Albert JI, Wahlber J, Leitner T, Escanilla D, Uhlen M. Analysis of A Rape Case by Direct Sequencing of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pol and Gag Gnes. *Journal of Virology*. 1994;68.9.5918-24
4. Leitner T, Escanillat D, Marquing S, Walberg J, Brostrom, Hasson HB. Biological and Molecular Characterization of Subtype D, G, and A/D recombinant HIV-1 Transmission in Sweden. *Virology*. 1995;209:136-46.
5. Leitner T, Escanillat D, Franzent C, Uhlen M, Albert J. Accurate Reconstruction of A Known HIV-1 Transmission History by Phy-

- logenetic Tree Analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93:10864-9.
6. Leitner T, Korber B, Daniels M, Calef C, Foley B. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) References. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. 2005.p.41-7.
 7. Panteleeff, D Dev, John G, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Richardson B. Rapid Method for Screening Dried Blood Samples on Filter Paper for Screening Dried Blood Samples on Filter Paper for Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA. J of Clini Microbiol. 1999;37(2):350-3.
 8. Robertson DL, Hahn BH, Sharp PM. Recombination in AIDS Viruses. J Mol Evol. 1995;40(3):249-59.
 9. Antunes R, Figueiredo S, Ba'rtolo IS, Pinheiro M, Rosado L, Soares I. Plasma Samples from A Pediatric Population Predominantly Infected with Human Immunodeficiency Virus type 1 Subtype G and BG Recombinant Forms. J of Clin Microbio. 2003;(41):3361-67.
 10. Ndembu N, Abraha A, Pilch H, Ichimura H, Mbanya D, Kapture Z, Salata R, Arts EJ: Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and HIV-2 in Yaounde, Cameroon: Evidence of Major Drug Resistance Mutations on Newly Diagnosed Patients Infected with Subtypes Other than Subtype B, Journal of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology. 2008;46/1,177-84.
 11. Khamadi S A, Lihana RW, Osman S, Mwangi J, Muriuki J, Lagat N. Genetic Diversity of HIV. Type 1 along the Coastal Strip of Kenya. AID Research and Human Retroviruses. 2009;25(9):919-23.
 12. Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. HIV Diversity, Recombination and Disease Progression: How Does Fitness "Fit" Into The Puzzle? AIDS Reviews. 2007;9:87-97.
 13. Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Who-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. "Estimated Global Distribution and Regional Spread of HIV-1 Genetic Subtypes in the Year 2000". Acquir. Immune. Defic. Syndr. 2002;29(2):184-90.
 14. Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the Spread of HIV-1 Genetic Variants. Lancet Infect Dis. 2003;3(1):22-7.

