INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

IJCP & ML (Maj. Pat. Klin. Indonesia & Lab. Med.)	Vol. 20	No. 2	Hal. 73-169	Surabaya Maret 2014	ISSN 0854-4263
---	---------	-------	-------------	------------------------	-------------------

Diterbitkan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terakreditasi No: 66b/DIKTI/KEP/2011, Tanggal 9 September 2011

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

Susunan Pengelola Jurnal Ilmiah Patologi Klinik Indonesia
(*Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*)
Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia Masa Bakti 2013–2016
(surat keputusan pengurus pusat PDSPATKLIN Nomor 008/PP-PATKLIN/III/2014)

Pelindung:

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Ketua:

Puspa Wardhani

Wakil Ketua:

Maimun Zulhaidah Arthamin

Sekretaris:

Dian Wahyu Utami

Bendahara:

Bastiana Bermawi

Anggota:

Osman D. Sianipar

Penelaah Ahli:

Riadi Wirawan, AAG. Sudewa, Rustadi Sosrosuhardjo, Rahayuningsih Dharma, Mansyur Arif

Penelaah Pelaksana:

Prihatini, July Kumalawati, Ida Parwati, Tahono, FM. Judajana, Krisnowati, Nurhayana Sennang Andi Nanggung, Aryati, Purwanto AP, Jusak Nugraha, Sidarti Soehita, Maimun Zulhaidah Arthamin, Endang Retnowati, Noormartany, Edi Widjajanto, Budi Mulyono, Adi Koesoema Aman, Uleng Bahrin, Ninik Sukartini, Kusworini Handono, JB. Soeparyatmo, M. Yolanda Probahoosodo, Rismawati Yaswir

Berlangganan:

3 kali terbit per tahun

Anggota dan anggota muda PDSPATKLIN mulai Tahun 2011 gratis setelah melunasi iuran

Bukan Anggota PDSPATKLIN: Rp 175.000,-/tahun

Uang dikirim ke alamat:

Bastiana Bermawi dr, SpPK

Bank Mandiri KCP SBY PDAM No AC: 142-00-1079020-1

Alamat Redaksi:

d/a Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 6–8 Surabaya.

Telp/Fax. (031) 5042113, 085-733220600 E-mail: majalah.ijcp@yahoo.com

Akreditasi No. 66/DIKTI/KEP/2011

INDONESIAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL LABORATORY

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

Metode <i>Bromcresol Green</i> (BCG) dan <i>Bromcresol Purple</i> (BCP) pada Sirosis Hati yang Mendapat Infus Albumin (<i>Bromcresol Green (BCG) and Bromcresol Purple (BCP) Methods in Liver Cirrhosis Patients Receiving Albumin Infusion</i>) Miftahul Ilmiah, Leonita Anniwati, Soehartini	73-79
Angka FIB-4 dan <i>Highly Active Anti Retroviral Therapy</i> di antara Pasien Pengidap Infeksi HIV (<i>FIB-4 Score and Highly Active Anti Retroviral Therapy Among HIV Infected Patients</i>) Liliana A, Noormartany, Sugianli AK	80-84
Hubungan Antara Umur, Umur Mulai Sakit, Lama Sakit dengan LED, CRP, DAS28-led di Arthritis Reumatoid (<i>Associations Between Age, Age at Onset, Disease Duration with ESR, CRP, DAS28-esr in Rheumatoid Arthritis</i>) J. Soeroso, FM. Judajana	85-92
Bakteri Patogen Aerob dan Uji Kepekaannya di Ruangan Bedah Pusat (<i>Testing of Aerobic Pathogenic Bacteria in Central Operating Rooms</i>) Agustini, Nurhayana Sennang, Benny Rusli	93-96
Rusip Sehubungan Profil Lipid dalam Keadaan Hiperkolesterolemia (<i>Rusip Related to the Lipid Profile in Hypercholesterolemia</i>) Indranila KS, Satrianugraha MD	97-102
Rerata Volume Trombosit, Hitung Leukosit dan Trombosit di Apendisitis Akut (<i>Mean Platelet Volume, White Blood Cell and Platelet Count in Acute Appendicitis</i>) Jayadi Festiawan, Nurhayana Sennang, Ibrahim Abdul Samad	103-106
Simvastatin Generik (<i>Generic Simvastatin</i>) DAR Rasmika Dewi, DG. Diah Dharma Santhi, DM Sukrama, AA. Raka Karsana	107-110
Genotipe dan Subtipe Virus Hepatitis B Penderita yang Terinfeksi Kronik Aktif (<i>Genotypes and Subtypes of Hepatitis B Virus in Chronic Active Hepatitis B Infection</i>) Gondo Mastutik, Juniastuti, Ali Rohman, Mochamad Amin, Poernomo Boedi Setiawan	111-115
Peramalan Sepsis Akibat Procalcitonin Terkait Keluaran Hasil Klinis (<i>The Prediction of Sepsis Due to Procalcitonin Related to Clinical Outcome</i>) Umi S. Intansari, Nunung Dartini, Kismardhani	116-121
Kadar TGF- β 1 Plasma dan Limfosit-T CD4 ⁺ di Penderita yang Terinfeksi HIV Stadium I (<i>Plasma Levels of TGF-β1 and CD4⁺ T-lymphocytes Stage I HIV-Infected Patients</i>) Alberthina, Endang R, Erwin AT	122-127
Sari Etanol, Etil Asetat Alang-alang (<i>Imperata Cylindrica</i>) terhadap Superoxide Dismutase (SOD) (<i>Ethanol Extract and Ethyl Acetate of Alang-alang (Imperata Cylindrica) on Superoxide Dismutase (SOD)</i>) St Khaerunnisa, Sutji Kuswarini, Suhartati, Lina Lukitasari, Ira Humairah, Reza Arta BN, Gwenny IP	128-132

Sekuens Terawetkan Terkait HIV-1 (<i>Conserved Sequences and HIV-1</i>) Efrida, Andani Eka Putra	133–140
Pengaruh Merokok Sigaret pada Pemeriksaan Resisten Aspirin (<i>Effects of Cigarette Smoking on Laboratory Aspirin Resistance</i>) D.I.S Siregar, Z. Lubis, H. Hariman	141–146
Kadar Kalium di Packed Red Cells Simpanan (<i>Potassium Levels in Stored Packed Red Cells</i>) Angeline Sutjianto, Asvin Nurulita, Fitriani Mangarengi	147–149
Keabsahan Engrailed-2 di Kanker Prostat (<i>Validity of Engrailed-2 in Prostate Cancer</i>) Elsa Yulius, Ida Parwati, Anna Tjandrawati, Dewi Kartika T	150–153
TELAAH PUSTAKA	
Petanda Biologik Terkini Lupus Nefritis (<i>Update Biomarkers of Lupus Nephritis</i>) Hani Susianti, Kusworini Handono	154–159
LAPORAN KASUS	
Pemeriksaan CKMB dan Hs-troponin T pada Pasien Infark Jantung dengan Peningkatan Segmen Non-ST (<i>Examination of CKMB and High Sensitive Troponin T in Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction Patients</i>) AK. Salim, M. Suryaatmadja, Hanafi DA	160–167
INFO LABORATORIUM MEDIK TERBARU.....	168–169

Ucapan terimakasih kepada penyunting Vol 20 No. 2 Maret 2014

Puspa Wardhani, Kusworini Handono, Riadi Wirawan, Maimun Zulhaidah Arthamin,
Sidarti Soehita, Jusak Nugraha, Prihatini, Purwanto AP, AAG. Sudewa

SEKUENS TERAWETKAN TERKAIT HIV-1

(Conserved Sequences and HIV-1)

Efrida¹, Andani Eka Putra²

ABSTRACT

Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) have the high levels of genetic variability (molecular variation) related to the mechanism of deletions, insertions, and especially as a recombination. The recombination between subgroups and their inter subtype HIV-1 produces a new virus strain causing a certain infection. Until now there were about 40 circulating recombinant form (CRF) and 100 unique recombinant forms (URF) worldwide. Various HIV-1 molecular variation cause pitfalls HIV detection due to the difficulty test designed to detect all HIV-1 strains. The purpose of this study was to know the determination of the molecular variation that can identify the HIV-1 genome sequences which are conserved from local isolates of West Sumatera. The method used is a descriptive study on samples of patients suspected of being infected by HIV-1 based on the antibody screening results using rapid HIV-1 test in the laboratory of Clinical Pathology at Dr. M. Djamil Hospital Padang. The RNA isolation and amplification by RT-PCR was performed at the Microbiology Department, Faculty of Medicine of UGM. The amplicons were sequenced using the Sanger method and analyzed by Clustal W with sequence data from the HIV its database. The major subtypes of HIV-1 isolates derived from local West Sumatra is AE/B with four (4) isolates (57.1%), followed by subtype AE, 2 isolates (28.6%) and B, 1 isolates (14.3%). Most of the molecular variation in this study related to the substitution of one base followed by deletions and insertions. The protease showed a wide variation, which consists of 20–37 substitutions and 1–3 deletions. p24 is a highly conserved gene, followed by gp120 and vpu. Based on this study, it can be concluded that the isolates of HIV-1 recombination is the biggest proportion with conserved region found at p24 of protein group of the gag.

Key words: HIV-1, molecular variation, recombination, sequences, conserved

ABSTRAK

Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) memiliki tingkat keragaman genetik (ragaman molekular) yang tinggi terkait dengan mekanisme penghapusan, penyisipan dan terutama penggabungan kembali. Penggabungan kembali antar subgrup/intersubtype HIV-1 menghasilkan galur virus baru penyebab infeksi. Sampai saat ini diketahui bahwa terdapat sekitar 40 *circulating recombinant form* (CRF) dan 100 *unique recombinant form* (URF) di seluruh dunia. Berbagai ragam molekular HIV-1 tersebut menyebabkan *pitfalls* deteksi HIV karena kesulitan merancang pengujian yang dapat menemukan seluruh galur HIV-1. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui ragam molekular, sehingga dapat diidentifikasi sekuens genom HIV-1 terawetkan dari isolat lokal asal Sumatera Barat. Cara yang digunakan adalah penelitian deskriptif terhadap sampel penderita yang dicurigai terinfeksi HIV-1 berdasarkan hasil penyaringan antibodi menggunakan uji cepat HIV-1 di laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. M. Djamil Padang. Isolasi RNA dan penguatan dengan RT-PCR dilakukan di bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM. Penguat disekuensing menggunakan metode Sanger dan dianalisis dengan Clustal W disertai data sekuens dari HIV *sequence database*. Subtype HIV-1 isolat utama lokal asal Sumatera Barat adalah AE/B sebanyak empat (4) buah isolat (57,1%), disusul oleh subtype AE dua (2) buah (28,6%) dan B, satu (1) buah (14,3%). Sebagian besar ragam molekular pada penelitian ini berkaitan dengan substitusi satu (1) basa disusul oleh penghapusan dan penyisipan. Protease memperlihatkan besar ragam yang cukup luas, yang terdiri dari 20–37 substitusi dan penghapusan sebanyak satu sampai dengan empat (1–3). Gen p24 merupakan yang sangat terawetkan disusul oleh gp120 dan vpu. Didasari telitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat penggabungan kembali HIV-1 merupakan perbandingan terbesar dengan daerah terawetkan yang ditemukan di p24 dari kelompok protein gag.

Kata kunci: HIV-1, ragam molekular, rekombinasi, sekuens, terawetkan

PENDAHULUAN

Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) bersifat pandemik yaitu keberadaan penyakit tertentu yang ditemukan di seluruh dunia dan diperkirakan telah menginfeksi sekitar 40 juta penduduknya. Sebagian besar tersebar di Sub Sahara Afrika, Asia dan Amerika Selatan.¹ Virus ini merupakan penyebab *Acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS).² Kementerian

Kesehatan (Kemenkes) Indonesia melaporkan dalam 25 tahun sejak kasus pertama tahun 1987, terdapat 76.879 kasus HIV positif dan 29.879 pengidap AIDS dengan kematian sebanyak 5430 kasus. Angka ini kemungkinan lebih besar karena banyak pengidap HIV/AIDS yang tidak melaporkan diri.³

Kejadian HIV/AIDS meningkat secara bermakna di seluruh dunia. Organisasi Perburuhan Internasional (ILO) dan Program Pembangunan Perserikatan

¹ Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas/RS. Dr. M. Djamil Padang. E-mail: efridasppk@yahoo.com

² Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang

Bangsa-Bangsa (UNDP) menyatakan Indonesia, India dan Cina adalah negara dengan jumlah pengidap dan peningkatan kasus HIV tertinggi di kawasan Asia Pasifik. Pada tahun 2001–2009, kasus HIV di Indonesia meningkat tiga kali lipat dan ditemukan di seluruh provinsi (33 provinsi) pada tahun 2004 hanya dilaporkan di 11 provinsi.⁴

Human Immunodeficiency Virus-1 dengan genom RNA merupakan anggota famili *retroviridae* genus *lentivirus*. Ciri infeksi akibat famili virus ini adalah penyakitnya tersembunyi, replikasi persisten dan dapat mengenai sistem saraf pusat.^{2,5} Telitian yang ada menunjukkan kecenderungan ragam molekular (keragaman genetik) HIV-1 yang berkaitan dengan penggabungan kembali dan perpindahan (hapusan atau sisipan).^{6,7}

Mekanisme utama tahapan pengembangan HIV-1 adalah penggabungan kembali antar subgrup/intersubtype HIV. Penggabungan kembali menghasilkan galur virus baru penyebab infeksi yang berpengaruh terhadap penetapan diagnosis, resistensi terhadap pengobatan dan pengembangan vaksin.^{6,7} Sekitar 20% isolat yang ditemukan di seluruh dunia merupakan bentuk penggabungan kembali antar subgrup/intersubtype. Penggabungan kembali ini dikelompokkan atas *Circulating recombinant form* (CRF) dan *Unique recombinant form* (URF). Sampai saat ini terdapat sekitar 40 CRF dan 100 URF.^{8,9} Berbagai ragam molekular/keragaman genetik tersebut menyebabkan *pitfalls* deteksi HIV-1.

Virus HIV-1 menyandi tiga (3) gen penyusunan, yaitu *gag*, *pol* dan *env* dengan tata-urutan 5'LTR *gag* – *pol* – *env* LTR 3'. Ketiganya merupakan protein leburan yang dipecah menggunakan protease. *Gag* dan *env* menyandi nukleokapsid dan glikoprotein membran virus, sedangkan *pol* menyandi protein *reverse transcriptase* dan *integrase*. Virus juga mempunyai tujuh (7) gen pengatur, yaitu *tat*, *rev*, *tev*, *vpu*, *vpr*, *vif*, and *nef*.¹⁰ Analisis molekular memperlihatkan sekuens HIV-1 yang terdiri dari 9500 – 9700 bp, 1500 bp *gag*, 3000 bp *pol* dan 2500 *env*. Sisanya merupakan gen pengatur yang berkisar antara 250 – 750 bp.¹¹

Analisis gen *env* galur HIV-1 dari berbagai regio geografis menunjukkan bahwa HIV-1 terdiri atas tiga (3) kelompok utama, yaitu M (*main*), O (*outlier*) dan N (*non-M/-O*). Kelompok M merupakan golongan HIV-1 terbanyak (>90% infeksi di dunia disebabkan kelompok M). HIV-1 kelompok M terdiri atas 10 subtype (A-J) serta bentuk rekombinan CRF seperti: AE, AG, AB, DF, BC, CD dan berbagai bentuk lainnya. Di samping itu terdapat sub-subtype A (A1, A2) dan F (F1, F2). Kelompok O dan N secara genetik berbeda dengan yang M, terutama temuan di Afrika Barat. Kelompok O terdiri atas tiga (3) penutup (*clades*) utama yaitu A, B, dan C.^{6,12}

Penggabungan kembali yang terjadi di antara subgrup/subtype menyebabkan terbentuk ragam virus baru. Sebagai contoh adalah CRF02AG, merupakan penggabungan kembali antara subtype A dan G yang menguasai di Afrika Barat (saat ini ditemukan pula di Eropa, US dan Amerika Selatan), CRF01_AE (penggabungan kembali subtype A1 dan E, menguasai di Asia Tenggara), CRF-BC merupakan penggabungan kembali antara subgrup B (ditemukan di Thailand tahun 1989) dengan kelompok C (ditemukan pada tahun 1992 di Yunan, Cina). Sampai saat ini CRF telah diidentifikasi hampir di seluruh kawasan dunia karena terdapat dua atau lebih subtype virus yang ikutan beredar.^{6,13} Diperkirakan kecepatan perpindahan virus HIV-1 mencapai $8,3 \times 10^{-3}$ nukleotida per tempat setiap tahun hanya untuk gen yang menyandi envelop.¹⁴

Env menghasilkan dua glikoprotein yang melekat di permukaan dalam, berbentuk trimer, yaitu glikoprotein permukaan (SU) dan glikoprotein transmembran (TM), masing-masing dengan berat molekul 120–125 (gp120–125) dan 36–41 kDa (gp 36–41). Analisis sekuens memperlihatkan SU dibagi atas lima regio hipervariabel (V1-V5) dan lima terawetkan (C1-C5) yang terletak di antara hipervariabel. Analisis terhadap daerah ini sangat penting karena mempunyai potensi imunogenik yang tinggi.^{15,16}

Gag merupakan gen yang menyandi poliprotein dan terdiri atas matriks (MA), nukleokapsid (NC), kapsid (CA) dan domain p6. *Gag* dan *env* mempunyai sekuens genetik yang stabil, hal tersebut ditandai dengan respons imunitas sel TCD4 yang homogen. Namun demikian, sejumlah telitian lain menemukan peningkatan perpindahan gen *gag*. Ditemukan penghapusan 11 asam amino dari *gag* tidak mempengaruhi pembentukan virus baru¹⁷ sedangkan peneliti lain menemukan perpindahan di A426G dari CRF_01AE yang akan mengganggu hasil virion dan morfogenesis virus.¹⁸

Analisis terhadap gen pengatur menunjukkan ragam molekular yang cukup besar. Gen *tat* mempunyai dua (2) ekson dan tujuh (7) region. Analisis sekuens memperlihatkan bahwa regio gen ini yang terawetkan hanya sekitar 20%. Ragam molekular di *rev* dan *vpu* dapat mengganggu gen *env*.¹⁹ *Nef* merupakan gen pengatur yang berperan dalam replikasi optimal virus dan perkembangan penyakit ke arah AIDS. Penelitian menemukan dari 186 isolat terdapat kesamaan sekuens *Nef* sekitar 86%.^{19,20}

Keragaman genetik yang sangat tinggi mempengaruhi tampilan uji diagnostik hasil negatif palsu pada uji serologis, *virological follow-up* dan pengelolaan pengobatan.²¹

Beberapa uji *viral load* (kadar RNA HIV-1) komersial tidak dapat mendeteksi/mengkuantifikasi

secara tepat RNA virus dari pasien yang terinfeksi HIV-1 sub tipe non-B. Karena berbagai uji kadar RNA HIV-1 plasma tersebut hanya diutamakan untuk mendeteksi sub tipe B yang menguasai US dan Eropa. Sub tipe non-B tersebar luas dan menguasai negara lain termasuk yang berkembang, sehingga terjadi *underquantification viral load* (VL)/gagal mendeteksi HIV RNA sub tipe non-B. Hal tersebut membuktikan bahwa ragam sekuens di kawasan sasaran secara langsung mempengaruhi tampilan uji diagnostik.²² Oleh karena itu uji *viral load* komersial penting dimodifikasi, sehingga dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi secara cermat seluruh ragam HIV-1. Beberapa peneliti melaporkan perubahan tampilan beberapa metode diagnostik yang berlandaskan *genotyping* karena ragam genetik sekuens HIV-1 non-B yang menguasai Afrika. Sebagai contoh adalah ViroSeq HIV-1 *genotyping system* yang gagal menguatkan dan mensekuensing beberapa ragam non-B di Kamerun yang keragaman HIV-1 bertingkat tinggi (M, N, O, dari sub tipe M dan sejumlah *recombinant form*).^{23,24}

Keragaman genetik juga telah dilaporkan, bahwa hal tersebut terjadi akibat perpindahan titik tunggal regio gag yang menyebabkan kerendahan perkiraan pengukuran *viral load* (RNA HIV-1) dan hasil negatif palsu pada penyaringan.²⁵ Pengembangan primer berdasarkan regio imunodominan yang terawetkan diharapkan dapat meningkatkan kepekaan deteksi.

Keragaman genetik karena substitusi kecil asam amino di epitop imunodominan gp41 envelop HIV-1 kelompok M (sub tipe A-G) tidak mempengaruhi deteksi Ab (seluruh spesimen positif dengan perangkat EIA/*Enzyme immuno assay* dengan lisensi FDA/*Food Drug Administration*), tetapi tidak dapat disingkirkan kemungkinan spesimen dengan titer rendah Ab luput terdiagnosis oleh sarana ini. Salah satu penyebabnya adalah kemungkinan terdapat antibodi yang dihasilkan untuk protein penyusun lain yang menanggapi positif perangkat EIA tersebut, misalnya protein p24. Hal tersebut dibuktikan dengan ditemukan beberapa individu yang menunjukkan persistensi serum negatif terhadap metode EIA walaupun secara klinis AIDS (HIPS=*HIV-1 infected but persistently seronegative*). Respons antibodi yang negatif terhadap regio imunodominan gp41 tersebut dapat disebabkan oleh keragaman genetik di gen *env*, sehingga mengubah ikatan antibodi di uji serologik dan menghasilkan uji negatif palsu.²⁶

Tingkat keragaman genetik yang tinggi di regio imunodominan HIV-1 terutama kelompok M dan O menimbulkan kesulitan dalam merancang bentuk pengujian yang dapat mendeteksi seluruh galur HIV-1. Beberapa temuan terdapat laporan bahwa antibodi terhadap beberapa ragam HIV-1 kelompok O tidak dapat dideteksi dengan seluruh metode diagnostik

komersial.²⁷ Penelitian yang dilakukan oleh Koch terhadap tiga sampel HIV-1 kelompok M dan dua (2) dari HIV-1 kelompok O menunjukkan reaktivitas antibodi yang rendah (S/CO<1) dengan satu atau lebih EIA lisensi FDA. Setelah dianalisis sekuens kelima sampel I terhadap regio imunodominan gp41 ditemukan substitusi asam amino *cluster* I (AA 581-615) dan II (AA 646-682) untuk ketiga kelompok M dan substitusi beberapa asam amino untuk kelompok O. Oleh karena itu diperlukan pengembangan metode diagnostik yang terus-menerus guna mendeteksi kemunculan ragam baru HIV.²⁸ Hal tersebut diperkuat oleh temuan peneliti lain yang mengidentifikasi galur baru HIV-1 yang berbeda dari HIV-1 kelompok M dan O yaitu YBF 30. EIA yang menggunakan antibodi untuk mendeteksi HIV-1 kelompok M gagal mendapatkan galur baru tersebut. Penguatan proviral DNA YBF 30 juga tidak dapat dilakukan menggunakan set primer dari gen *env*, *gag*, *pol* HIV -1 kelompok M dan primer *gag/env* HIV-1 kelompok O.²⁹

Diagnosis HIV-1 secara pasti ditetapkan dengan kultur virus, tetapi pengerjaan ini memerlukan waktu yang lama. Metode lain yang dipakai adalah *Enzyme immuno assay* (EIA) untuk mendeteksi antigen atau antibodi yang khas HIV-1. Umumnya metode berlandaskan antigen-antibodi digunakan sebagai uji penapisan/penyaringan. Metode lain adalah hibridisasi menurut *Southern blot* terhadap gen utama HIV-1, *immunoblotting*, RT-PCR dan *real time* PCR. Penelitian berlandaskan molekular memerlukan analisis sekuens terlebih dahulu, sehingga dapat dirancang primer yang khas benar.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui ragam molekular gen yang terdapat di virus HIV-1 dan juga hal mengawetkan sekuens terhadap jumlah keseluruhan genom virus HIV dari isolat lokal.

Kepentingan atau keutamaan penelitian ini adalah: 1) untuk mengetahui perihal keterangan sekuens yang terawetkan dan akan dapat membuka peluang pengembangan metode mendiagnosis serta membuat vaksin, 2) Mengenali ragam molekular yang ditemukan dan dapat dijadikan bahan masukan terhadap peluang metode diagnosis yang telah ada.

METODE

Penelitian ini bersifat deskriptif, dilaksanakan selama delapan (8) bulan (Mei 2012–Desember 2012). Sampel penelitian adalah serum penderita yang dicurigai terinfeksi HIV-1 berdasarkan hasil tapisan antibodi menggunakan uji cepat HIV-1 di laboratorium Patologi Klinik RS. Dr. M. Djamil Padang. Subjek disertakan ke dalam penelitian setelah memahami dan menyetujui borang kepatutan penelitian. Data

klinis dan laboratoris dicatat di lembar tersendiri. Isolasi RNA dan penguatan dengan RT-PCR dilakukan di bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM. Penguat disekuensing menggunakan metode *Sanger* dan dianalisis dengan *Clustal W* disertai data sekuens HIV *sequence database*.

Rancangan Primer

Primer ditujukan untuk jumlah keseluruhan genom HIV. Rancangan primer menggunakan perangkat lunak yang terdapat di primer 3 plus. Mengingat ukuran virus yang cukup besar, maka dirancang 14 pasang primer dengan penggandaan di ujung daerah sasaran. Primer yang didapat dianalisis kekhasannya menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)* dari *software open source* yang terdapat di dalam NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Isolasi RNA

mRNA HIV-1 disarikan dari sampel serum menggunakan QIAamp Viral RNA perangkat kecil (Qiagen). Tatalangkah kerja sesuai dengan aturan kerja yang disarankan oleh pabrik.

Penguatan dengan RT-PCR

Penguatan menggunakan *Taq PCR Master Mix* (Qiagen). Tatalangkah kerja disesuaikan dengan aturan kerja yang disarankan. Penyesuaian terbagus suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan hasil yang baik. Hasilan PCR dianalisis dengan gel agarose 0,8% dan diwarnai dengan *Cybergreen*.

Sekuensing

Sekuensing dilakukan di *1st Base* Singapura dengan metode *Sanger* menggunakan primer *forward* dan *reverse* bergantian.

Analisis hasil sekuensing

Hasil sekuensing dianalisis dengan *Clustal W* menggunakan isolat yang ada ditambah dengan data sekuens HIV *Sequence Database*.

Analisis Data

Data yang terkumpul akan diolah menggunakan program statistik komputer. Setiap variabel yang diperiksa disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel.

Tabel 1. Susunan primer

No	Nama	Sekuens	Daerah penguatan
1	F-H781 R-H781	TCGACGCAGGACTCGGCTTG CTGCTATGTCACTTCCCCTTG GTT	1-781
2	F-H1484 R-H1484	GACCATCAATGAGGAAGCTGCAGA TGAGAGGGAGTCGCTGTTTCTT	701-1484
3	F-H2162 R-H2162	AGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGA GCATCACCCACATCCAGTACTGTT	1464-2162
4	F-H2903 R-H2903	ACCACATCCCGCAGGGTTAAAA TGAGCACCCCTCATTCTTGCAT	2126-2903
5	F-H3646 R-3646	GGGGCTAGCACAAATGGACATATCA CAGTCTACTTGTCCATGCATGGCT	2838-3646
6	F-H344 R-H344	AGGAGAAGCCATGCATGGACAA (TCCTCATCCTGTCTACTTGCCA	3640-4344
7	F-H5134 R-H5134	TGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAG AGGTTGACTTCCTGGATGCTTC	4340-5134
8	F-H5786 R-H5786	GGAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTA CCTCATGCATCTGTTCTACCATGT	5137 – 5786
9	F-H6436 R-H6436	CAGACCCTAACCACAAGAAGT TGCATAAATTGCTCTCCCTGGTC	5720-6434
10	F-H7244 R-H2744	TTGTACGAGACCCGGCAACAAT TCTTTCACAGCCAGGATTC TTGC	6391-7244
11	F-H7935 R-7935	TGGATTTCGTTGAACGTGT CGAAGT CTAAGGTAGGTCCGAATTGGCATG	7230-7935
12	F-H8514 R-H8514	TCCGAGCAAGATTTGGAGGTACTGA GGTCATAAATCTGTTGTACGGTCAT	7920-8514
13	F-H9207 R-H9207	GCTTTGAACCGTTGTACATGTA TTGACATGACACAGTTGTGAATC	8503-9207
14	F-H9715 R-H9715	GATTCGAGGACCTAGCTGATGAT CTGACTGATGGCCATTAGGCTAG	9176-9715

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada awal penelitian direncanakan menganalisis RNA. Mengingat RNA bersifat goyah dan mudah rusak, disepakati analisis dilakukan terhadap proviral HIV dalam bentuk DNA *double stranded*. Proviral DNA merupakan bentuk virus dalam tubuh pejamu sebelum berpadu ke dalam genom pejamu. DNA dibentuk oleh enzim *reverse transcriptase* yang disandi oleh virus di gen pol.

Penelitian ini menggunakan 14 pasang primer yang disusun secara *overlapping* dan memperkuat daerah dengan ukuran 9600 bp. Hasil menguatkan diperbaiki menggunakan *Bioedit*, sehingga didapatkan sekuens tunggal. Pada tahap selanjutnya hasil kuatan disesuaikan, sehingga dapat disusun satu genom HIV. Pada penelitian ini dianalisis sembilan (9) sampel. Pada saat sekuensing, primer nomor 7 dari sampel nomor 8 tidak dapat diperkuatkan dengan baik, sehingga sampel tersebut dikeluarkan. Pada tahapan penyesuaian, sampel nomor 5 tidak dapat disusun dengan baik, karena *overlapping* sangat besar, sehingga sampel nomor 5 (lima) juga dikeluarkan {(jumlah keseluruhan tujuh (7) sampel yang dapat dianalisis)}.

Analisis subtype

Subtipe sekuens sampel dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Komponen yang dianalisis adalah tingkat kesesuaian dengan isolat rujukan. Pada penelitian ini digunakan sejumlah isolat rujukan, yaitu isolat baku (K03455.1), FD (AF193253), A2D (AF457060), AE/B (AF516184), F2 (AJ249236), BC (AX14977.1), B (AY173951) dan AE (CM240).

Analisis subtype ini juga dilakukan terhadap isolat rujukan yang lain, tetapi tidak memperlihatkan kedekatan genomik, sehingga tidak dicantumkan. Isolat penelitian disandi dengan tanda SAE-001 sampai SAE-009, tetapi analisis tidak dilakukan terhadap SAE-005 dan SAE-008.

Untuk mengetahui subtype virus HIV-1 disusun tabel silang, sampel bertingkat kesesuaian yang tertinggi daripada dengan isolat rujukan merupakan jenis yang sesuai dengan rujukan tersebut. Didasari tabel silang dapat diketahui, bahwa sampel SAE-001 mempunyai kesesuaian tertinggi dengan AF516184.1 (97%), sehingga masuk subtype AE/B. Pola yang sama juga ditemukan di sampel: SAE-002, SAE-006 dan SAE-009. Sebaliknya, SAE 003 dan SAE-007 mempunyai kesesuaian tertinggi dengan CM240, sehingga dimasukkan ke subtype AE. SAE-004 yang sama dengan AY173951 dan dimasukkan ke dalam subtype B.

Berdasarkan data telitian ini, dari tujuh (7) isolat yang dianalisis, empat (4) di antaranya (57,1%) adalah subtype AE/B, dua (2) (28,6%) subtype AE dan satu (1) (14,3%) subtype B. Data tabel silang memperlihatkan isolat lokal SAE-001 hingga SAE-009 mempunyai kesesuaian yang erat di antara kelompok tersebut, serta juga dengan rujukan AE dan B.

Keragaman Molekular

Keragaman molekular didasarkan kepada yang terkait isolat lokal dan ditemukan pada penelitian ini dengan isolat HIV baku (K03455.1). Pemetaan genom virus HIV-1 membaginya atas tiga (3) daerah

Tabel 2. Persentase kesesuaian berdasarkan hasil alignment menggunakan BLAST

Cross	K034 55.1	AF19 3253	AF45 7060	AF51 6184	AJ24 9236	AX14 977,1	AY17 3951	CM 240	SAE 001	SAE 002	SAE 003	SAE 004	SAE 006	SAE 007	SAE 009
K03455.1															
AF193253	86														
AF457060	84	93													
AF516184	83	86	88												
AJ249236	88	83	88	86											
AX14977.1	86	88	87	90	85										
AY173951	93	84	86	93	84	90									
CM240	88	89	85	92	87	86	86								
SAE-001	85	86	87	97	84	88	95	92							
SAE-002	84	83	85	96	88	88	92	90	98						
SAE-003	85	82	84	95	85	87	90	97	93	93					
SAE-004	87	87	82	93	83	90	98	89	92	89	90				
Cross	K034 55.1	AF19 3253	AF45 7060	AF51 6184	AJ24 9236	AX14 977,1	AY17 3951	CM 240	SAE 001	SAE 002	-SAE- 003	SAE 004	SAE 006	SAE 007	SAE 009
SAE-006	83	85	83	95	84	83	91	91	97	90	92	93			
SAE-007	85	86	86	96	81	82	90	98	95	94	98	93	91		
SAE-009	86	83	83	97	86	87	93	92	99	92	93	90	89	91	

besar, yaitu: gag, pol, dan env, serta juga di beberapa daerah kecil, seperti: tat, vif, vpr, vpu, nef dan ref. Secara genomik virus ini dibagi atas tiga (3) bingkai berdasarkan perimpitan pembuatan protein.

Analisis keragaman molekular sebagian besar menemukan pola subsitusi, penghapusan atau penyisipan. Pada penelitian ini rekombinasi tidak dianalisis. Rekombinasi hanya ditentukan berdasarkan genom rujukan untuk menentukan subtype. Gen yang menyandi protease memperlihatkan ragaman yang cukup luas, yang terdiri dari 20–37 subsitusi dan 1–3 hapusan. Corak dan ragaman yang hampir sama ditemukan di vpr, ref, gp120 dan gp41, tetapi kekerapan kejadian lebih rendah daripada di kedua sekuens ini.

Daerah terawetkan

Analisis sekuens daerah terawetkan yang lebih dari 300 bp memperlihatkan bahwa, p24 merupakan gen yang sangat terawetkan. Keragaman sekitar 2,27% dengan selang 1,4%–3,3%, disusul oleh gp120 dengan

keragaman 2,42% dan selang 2,1%–3,8%. Sekuens lain yang terlihat terawetkan adalah vpu dengan keragaman 3,03% dan selang 1,2%–4,0%.

Analisis genomik terhadap tujuh (7) isolat HIV lokal Sumatera Barat menggunakan 14 pasang primer yang dirancang berhimpitan satu sama lain telah dilakukan. Analisis dilakukan satu persatu terhadap isolat HIV baku (K03455.1) baik secara penghitungan komputasi maupun dengan manual. Penentuan subtype didasarkan pada sekuens jumlah keseluruhan genom rujukan. Pada penelitian ini digunakan beberapa sekuens rujukan, antara lain FD (AF193253), A2D (AF457060), AE/B (AF516184), F2 (AJ249236), BC (AX14977.1), B (AY173951) dan AE (CM240).

Analisis genomik terhadap sekuens baku memperlihatkan pembuatan protein HIV disandi oleh gen yang saling berhimpitan, sehingga para ahli sepakat menetapkan genom HIV terdiri atas tiga (3) bingkai. Bingkai pertama menyandi protein gag, vif, tat dan nef. Bingkai kedua menyandi protein vpu dan rev, sedangkan yang ketiga menyandi protein pol, vpr dan env.

Tabel 3. Jenis dan jumlah ragaman isolat lokal yang diperbandingkan dengan yang baku

Nama	Posisi	Perpindahan						
		001	002	003	004	006	007	009
5LTR	1–634	26S	32S	42S	27S	32S, 2D	14S, 4D	35S
P17	790–1185	41S	38S	28S	37S	38S, 1D	35S	43S, 2D
P24	1186–1878	12S	14S	19S	23S	15S	18S	8S, 2D
P2	1879–1920	1S, 1D	IS	3S	0	0	2S	2S
P7	1921–2085	5S, 1D	3S	6S	4S	6S	2S, 1D	6S
P1	2086–2133	6S	3S	5S	7S	3S	2S	2S
P6	2134–2292	6S	3S	5S	4S	5S	4S	6S
Protease	2253–2549	37S, 2D	35S	25S, 3D	20S, 2I, 3D	30S, 1D	28S	30S
P51	2550–3869	37S	42S	43S	27S, 8D, 1I	45S	38S, 4D	51S, 2D
P15	3870–4229	18S	17S	20S	16S	32S	25S	19S
P31	4230–5096	25S	24S	18S	21S	15S	20S, 2D	26S
Vif	5041–5619	31S, 2D	29S, 1D	28S	37S	40S	26S	32S
Vpr	5559–5850	10S, 10D	9S	15S	12S, 3D	19S	14S, 9D	11S
Vpu	6062–6310	3S, 3D	4S, 5D	8S	10S, 7D	6S	1S, 2D	10S
		001	002	003	004	006	007	009
Tat1	5831–6045	1S, 1D	2S, 1D	4S	10S, 5D	5S	3S, 4D	2S
Tat2	8379–8469	3SNP	9SNP	2S	1SNP	5S	4S	5S, 1D
Rev1	5170–6045	31S, 10D	30S, 2D	26S	20S, 9D	18S, 6D	21S	8I
Rev2	8379–8653	6S	4S	1s	2S, 2D	15S	10S	8S
SignP	6225–6314	3S	5S	7S, 5D	3I	10SNP	9S	3S
Gp120	6315–7757	40S, 6D	31S	27S, 8D	38S	45S, 10D	33S	35S, 7D
Gp41	7758 – 8795	28S, 8D, 3I	27S, 7D, 4I	30S	25S	20S, 4D, 1I	30S, 10D	27S
Ref	8797–9417	36S, 1D	31S, 5D	32S	24S	38S, 3D	30S	35S, 2D
3LTR	9086–9219	27S	28S	19S	25S	20S	24S	37S

Catatan: S=subsitusi, D=Delesi (hapusan), I=Inseri (sisipan)

Tabel 4. Analisis daerah terawetkan jumlah keseluruhan genom HIV isolat Sumatera Barat

Nama	Ukuran (bp)	Perpindahan						
		001	002	003	004	006	007	009
5LTR	634	4,1	5	6,6	4,2	5,3	2,8	5,5
P17	396	1,03	9,6	7,1	9,3	9,8	8,8	1,1
P24	693	1,7	2	2,7	3,3	2,2	2,6	1,4
P2	42	4,8	2,4	7,1	0	0	4,8	4,8
P7	165	3,6	1,8	1,6	2,4	3,6	1,8	3,6
P1	48	12,5	6,25	10,4	14,6	6,25	4,2	4,2
P6	59	10,2	5,1	8,4	6,7	8,4	6,7	10,2
Protease	297	13,3	11,8	9,4	8,4	10,4	9,4	10,1
P51	320	11,6	13,1	13,4	11,2	14,1	13,1	16,5
P15	360	5	4,7	5,6	4,4	8,9	6,9	5,3
P31	867	2,9	2,8	2,1	2,4	1,7	2,5	2,99
Vif	579	5,7	5,2	4,8	6,4	6,9	4,5	5,5
Vpr	292	6,8	3,1	5,1	5,1	6,5	7,9	3,8
Vpu	249	2,4	3,6	3,2	6,8	2,4	1,2	4
Tat1	215	0,9	1,4	1,9	6,98	2,33	3,26	0,9
Tat2	96	3,1	9,38	2,1	1,1	5,2	4,2	6,2
Rev1	876	4,7	3,7	2,9	3,3	2,7	2,4	0,9
Rev2	275	2,18	1,5	0,7	1,4	5,5	3,6	2,9
SignP	90	3,3	5,6	13	3,3	11,1	10	3,3
Gp120	1443	3,2	2,1	2,4	2,6	3,8	2,3	2,9
Gp41	1038	3,7	3,7	2,9	2,4	3,4	3,8	2,6
Ref	621	5,9	5,8	5,1	4	6,6	4,8	5,9
3LTR	634	4,3	4,4	3,6	4,2	3,7	4,1	5,8

Catatan: S = substitusi, D = Delesi (hapusan), I = Inseri (sisipan)

Berdasarkan data sejumlah telitian diketahui bahwa HIV-1 dikelompokkan menjadi jenis M, N, dan O. Kelompok M adalah yang paling sering dijumpai dan terbagi menjadi 10–12 sub tipe/penutup (*clade*) berdasarkan keseluruhan genom yang secara geografis berbeda, yaitu sub tipe: A, B, C, D, E, F, G, H, J dan K. 8–11. Sub tipe HIV ini selanjutnya dibagi lagi menjadi antara lain A1, A2, F1 dan F2. Dikemukakan bahwa sub tipe HIV yang berbeda dapat tidak sama bentuk pula dampak pemindahannya (penularan), timbulnya resistensi obat, maupun keparahan penyakit.

Dikemukakan pula bahwa jumlah penyakit terbanyak adalah terkait 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 sub tipe jumlah penyakit global, yaitu: 47,2% infeksi di seluruh dunia adalah yang: C, 26,7% A/CRF02-AG, 12,3% B, 5,3% D, 3,2% CRF-AE dan sisanya 5,3% terdiri dari bentuk jenis lain serta CRFs.

Didasari tujuh (7) isolat yang diteliti, para peneliti menemukan empat (4) sebesar (57,1%) adalah sub tipe AE/B, dua (2) (28,6%) turunan AE dan satu (1) (14,3%) B. Penelitian di Surabaya terhadap sekuens protein gag memperlihatkan sub tipe AE merupakan kelompok terbanyak, yang mencapai 57,14%. Data ini terlihat berbeda dengan yang para peneliti temukan. Hasil tersebut kemungkinan berkaitan dengan contoh analisis sekuens (peneliti menganalisis jumlah keseluruhan genom).

Sebagian besar ragam molekuler pada penelitian ini berkaitan dengan substitusi satu (1) basa disusul penghapusan dan penyisipan. Protease memperlihatkan ragam yang cukup luas, yang terdiri dari 20–37 substitusi dan 1–3 hapusan. Corak dan ragam yang hampir sama ditemukan di vpr, ref, gp120 dan gp41, tetapi kekerapan kejadian lebih rendah di kedua sekuens ini. Rerata ragam yang ditemukan pada penelitian ini adalah 9,3% berdasarkan analisis dengan *BLAST* dan *Clustal W*.

Analisis sekuens daerah terawetkan yang lebih dari 300 bp memperlihatkan bahwa, p24 merupakan gen yang sangat terawetkan. Ragaman sekitar 2,27% dengan selang 1,4–3,3%, disusul oleh gp120 yang beragam 2,42% dan selang 2,1–3,8%. Sekuens lain yang terlihat *conserved* adalah vpu dengan ragam 3,03% dan selang 1,2–4,0%.

Para peneliti menyadari bahwa masih banyak kekurangan dari kajian ini. Keterbatasan dana dan nukleotida yang banyak dan harus dianalisis menyebabkan penganalisisan genomik hanya bisa dilakukan terhadap sembilan (9) sampel. Penelitian yang bersifat kerja sama dengan berbagai pusat

Gambar 3. Pemetaan genomik virus HIV

pendidikan di Indonesia sangat diperlukan untuk dapat menggambarkan berbagai ragam molekuler daerah terawatkan dari sekuens HIV-1 di Indonesia.

SIMPULAN DAN SARAN

Didasari telitian ini disimpulkan bahwa: Subtipe utama HIV isolat lokal Sumatera Barat adalah AE/B dengan empat (4) sebesar (57,1%), disusul oleh AE, memiliki dua (2) (28,6%), sedangkan B punya satu (1) sebesar (14,3%). Sebagian besar ragam molekuler pada penelitian ini berkaitan dengan subsitusi satu (1) basa disusul oleh hapusan dan sisipan. Protease memperlihatkan ragam yang cukup luas, terdiri dari 20–37 subsitusi dan 1–3 hapusan. p24 merupakan gen yang sangat terawatkan, disusul oleh gp120 dan vpu.

Berdasarkan kajian tersebut perlu dianalisis yang lebih mendalam untuk menganalisis corak penggabungan kembali yang terjadi menggunakan teknik perhitungan serta penyesuaian terbaik primernya berdasarkan pola ragam molekuler, sehingga untuk berbagai isolat dapat digunakan secara universal.

DAFTAR PUSTAKA

- WHO. Global HIV/AIDS Response. Jenewa, WHO, 2011. Diunduh dari www.who.int/hiv/pub/progress_report tanggal 20 Juni 2013.
- Gallo RC. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983; 220:865–67.
- Kemenkes. Statistik Kasus HIV/AIDS di Indonesia. Jakarta, Kemenkes, 2011. Diunduh dari www.academia.edu/.../statistik_kasus_HIV_AIDS_di_Indonesia tanggal 20 Juni 2013.
- Susanto. Kasus HIV mulai masuki fase lampu kuning. *Media Indonesia*. Kamis, 22 November 2012; 15.
- Sharp PM, Hahn BH. The evolution and the origin of AIDS. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2010; 365: 2487–94.
- Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res*. 2005; 121: 287–314.
- Lihana RW, Semwanga D, Abimiku A, Ndembu N. Update on HIV-1 diversity in Africa: A decade in review. *AIDS Rev*. 2012; 14: 83–100.
- Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I. 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*. 2010; 7: 25–35.
- Kraus MH, Parrish NF, Shaw KS, Decker JM, Keele BF, Salazar-Gonzalez JF, *et al*. A rev1-vpu polymorphism unique to HIV-1 subtype A and C strains impairs envelope glycoprotein expression from rev-vpu-env cassettes and reduces virion infectivity in pseudotyping assays. *J virol*. 2010; 297: 346–71.
- Qi M, Aiken C. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology*. 2008; 373: 287–97.
- Cho YK, Jung YS, Foley BT. 2011. Phylogenetic Analysis of Full-Length pol Gene from Korean Hemophiliacs and Plasma Donors Infected with Korean Subclade B of HIV Type 1. *AIDS research and human retrovirus*. 2011; 27: 613–21.
- Sampathkumar R, Shadabi E, Luo M. Interplay between HIV-1 and host genetic variation: A snapshot into its impact on AIDS and therapy response. *Advances in virology*. 2012; 1–16.
- Frankenberry KD, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, Hu WS. Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses*. 2011; 3:1650–80.
- Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, *et al*. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*. 2010; 7: 25–32.
- Moore JP, Willey RL, Lewis GK, Robinson J, Sodroski J. Immunological Evidence for Interactions between the First, Second, and Fifth Conserved Domains of the gp120 Surface Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J virol*. 1994; 68: 6836–47.
- Barroso H, Borrego P, Bartolo I, Marcelino JM, Familia C, Quintas A, *et al*. Evolutionary and Structural Features of the C2, V3 and C3 Envelope Regions Underlying the Differences in HIV-1 and HIV-2 Biology and Infection. *PloS ONE*. 2011; 6: e14548.
- Ono A, Orenstein JM, Freed EO. Role of the Gag Matrix Domain in Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly. *J virol*. 2000; 74: 2855–66.
- Hamano T, Matsuo K, Hibi Y, Victoriano AF, Takahashi N, Irie S, *et al*. A Single-Nucleotide Synonymous Mutation in the gag Gene Controlling Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virion Production. *J virol*. 2007; 81: 1528–33.
- Kraus MH, Parrish NF, Shaw KS, Decker JM, Keele BF, Salazar-Gonzalez JF, *et al*. A rev1-vpu polymorphism unique to HIV-1 subtype A and C strains impairs envelope glycoprotein expression from rev-vpu-env cassettes and reduces virion infectivity in pseudotyping assays. *J virol*. 2010; 297: 346–71.
- Geyer M, Peterlin BM. Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef. *FEBS letters*. 2001; 496: 91–5.
- Plantier JC, Djemai M, Lemee V, Reggiani A, Leoz M, Burc L, *et al*. Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of HIV-1 group O infections. *JCM*. 2009; 47 (9): 2906–11.
- Amendola A, Bordi L, Angeletti C, Girardi E, Ippolito G, Capobianchi MR. Comparison of LCx with other current viral load assay for detecting and quantifying HIV-1 RNA patients infected with the circulating recombinant form A/G (CRF02). *JCM*. 2004; 811–5.
- Triques K, Coste J, Perret L, Segarra C, Reynes J, Mpoudi E, *et al*. Efficiencies of four versions of the HIV-1 MONITOR test for quantification of different subtypes of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *JCM*. 1999; 110–6.
- Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M.. High failure rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. *JCM*. 2011; 1635–41.
- Korn K, Weissbrich B, Henke-Gendo C, Heim A, Jauer CM, Taylor N, *et al*. Single-point mutation causing more than 100-fold underestimation of HIV-1 load with the Cobas taqman HIV-1 Real-Time PCR Assay. *JCM*. 2009; 1238–40.
- Dorn J, Masciotra S, Yang C, Downing R, Biryahwaho B, Mastro TD, *et al*. Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from HIV-1 group M and impact on HIV-1 antibody detection. *JCM*. 2000; 773–80.
- Yang C, Pieniazek D, Owen SM, Fridlund C, Nkengasong J, Mastro TD, *et al*. Detection of phylogenetically diverse HIV-1 groups M and O from plasma by using highly sensitive and specific generic primer. *JCM*. 1999; 2581–6.
- Koch WH, Sullivan PS, Roberts C, Francis K, Downing R, Mastro TD, *et al*. Evaluation of United States-Licensed HIV immunoassay for detection of group M viral variants. *JCM*. 2001; 39 (3): 1017–20.
- Simon F, Roques P, Loussert-Ataka I, Barre-Sinoussi F, Saragosti S, *et al*. Identification of a new HIV-1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine*. 2003; 1 (9): 1032–7.