

**Spatio-temporal and Population Dynamics of HIV-1 CRF35_AD
and Subtype B in Iran**

Sana Eybpoosh

A dissertation
submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Doctor of Philosophy

Kerman University of Medical Sciences

2016

Program Authorized to Offer Degree:

Epidemiology



چکیده

مقدمه و اهداف: سهم عمده‌ای از مبتلایان به ویروس اچ‌آی‌وی در کشور، آلوده به زیرگونه‌ی B و سویه‌ی نو ترکیب AD_35 (به ترتیب HIV-1B و CRF35_AD) هستند. هدف از این مطالعه برآورد زمان آغاز این اپیدمی‌ها، الگوی انتشار آن‌ها و تاریخچه‌ی رشد جمعیت مبتلایان به این سویه‌ها برای نخستین بار در کشور بود.

روش‌ها: این پژوهش یک تحلیل ثانویه بر روی تمامی توالی‌های ژنتیکی واجد شرایط HIV-1B (ژن *pol*) و CRF35_AD (ژن‌های *gag* و *pol*) ایرانی بود که در بانک ژنتیکی Los Alamos HIV در دسترس بودند. از توالی‌های موجود، مواردی که دارای جهش‌های frameshift یا stop codon بوده و یا به اشتباه تعیین زیرگونه شده بودند، از مطالعه خارج می‌شدند. تعیین زیرگونه با آنالیز فیلوژنتیک و به روش Maximum Likelihood انجام شد. تاریخچه‌ی جمعیتی و انتشار زمانی-مکانی ویروس با آنالیز فیلوجغرافی گسسته‌ی بیزین در نرم افزار BEAST v.1.8.1 بازسازی شد. نرخ انتشار ویروس بین ایران و سایر کشورها با استفاده از روش Bayesian stochastic search variable selection و در نرم افزار SPREAD v1.0.7 برآورد شد. بهترین مدل رشد جمعیت مبتلایان (رشد لجستیک) با استفاده از روش path sampling and Stepping stone sampling تعیین شد. اندازه‌ی جمعیت مبتلایان و نرخ رشد جمعیت تحت مدل لجستیک و در نرم افزار BEAST v.1.8.1 برآورد شد. به منظور ارزیابی تأثیرپذیری پارامترهای اصلی مورد بررسی نسبت به داده‌ها و مقادیر پیشینه‌ی برآورد، تحلیل حساسیت انجام شد.

یافته‌ها: تمامی توالی‌های CRF35_AD (افغانستان: ۱۳، پناهندگان افغانستانی مقیم پاکستان: ۳، ایران: ۴۴۰، ایالات متحده آمریکا: ۱؛ بازه‌ی زمانی نمونه‌گیری: ۹-۶ سال) و ۵۰۱ توالی HIV-1B بدست آمده از کشورهای دنیا (ایران: ۱۲، آسیا: ۱۶۷، اروپا: ۱۵۶، ایالات متحده‌ی آمریکا: ۱۶۶؛ بازه‌ی زمانی نمونه‌گیری: ۳۱ سال) وارد مطالعه شدند. از این میان، یک نمونه‌ی HIV-1B و ده نمونه‌ی CRF35_AD به دلیل وجود جهش‌های مقاومت دارویی از مطالعه حذف شدند. برای تمامی نمونه‌ها، تعیین اولیه‌ی زیرگونه تأیید گردید. جهش‌های frameshift و stop codon در داده‌ها مشاهده نشدند. توالی‌های CRF35_AD با توالی‌های والد از کشورهای کنیا و اوگاندا ($\text{PCC} > 0.7$) (Posterior Clade Credibility) و نمونه‌ای از پناهندگان افغانستانی مقیم پاکستان و بومیان پاکستان ($\text{PCC} = 0.9$) قرابت ژنتیکی نشان دادند. در نواحی ژنتیکی مورد بررسی، تمامی توالی‌های CRF35_AD بدست آمده از ایران، افغانستان، و پناهندگان افغانستانی مقیم پاکستان، تشکیل یک خوشه‌ی واحد دادند ($\text{PCC} > 0.7$). زمان انشقاق این خوشه (زمان آغاز این اپیدمی در افغانستان و ایران) حدود سال ۱۹۹۰ الی ۱۹۹۲ برآورد گردید (محدوده‌ی اطمینان بیزین: ۱۹۸۷-۱۹۹۴). در داخل این اپیدمی (خوشه)، انتقال ویروس بین ایران و افغانستان دوطرفه بود.

(نرخ انتشار: ۱، محدوده‌ی اطمینان ۹۵٪ بیزین: ۰/۱-۳/۵ رخداد انتقال در سال). باتوجه به تشابه قدمت و تنوع سویه‌های CRF35_AD افغانستانی و ایرانی، تقدم زمانی آغاز اپیدمی در این کشورها قابل تفکیک نبود. تحلیل‌های حساسیت تأثیرپذیری سایر پارامترها از داده‌ها و مقادیر پیشینه‌ی برآورد را رد کرد. نتایج پیشنهادکننده‌ی رشد نمایی اپیدمی CRF35_AD در ایران از زمان آغاز آن (سال ۱۹۹۰-۱۹۹۲) تا سال ۲۰۰۲-۱۹۹۵ است. پس از این زمان، نرخ رشد اپیدمی روند کاهشی را نشان داد (نرخ رشد جمعیت: ۰/۱-۰/۳ برابر در سال؛ زمان دوبرابر شدن جمعیت: ۲/۳-۴/۸ سال یکبار؛ اندازه‌ی موثر جمعیت $1/N_e$ ۵۰۰۵/۳-۵۱۳۰/۲ نفر). نتایج همچنین نشان داد که توالی‌های HIV-1B ایرانی مورد بررسی، دارای قرابت ژنتیکی با توالی‌های HIV-1B آلمانی هستند ($PCC > 0.7$). زمان ورود این سویه به ایران حدود سال ۱۹۷۴ برآورد گردید (محدوده‌ی اطمینان ۹۵٪ بیزین: ۱۹۷۶-۱۹۶۶). به دلیل محدود بودن تعداد توالی‌های HIV-1B ایرانی در دسترس، تاریخچه‌ی جمعیتی این سویه محاسبه نگردید.

نتیجه‌گیری: نتایج ما پیشنهاد می‌کند که ایزوله‌های CRF35_AD در دسترس از ایران و افغانستان و پناهندگان افغانستانی مقیم پاکستان در اصل تشکیل دهنده‌ی یک اپیدمی واحد بوده و در داخل این اپیدمی ویروس مکرراً در حال تبادل بین جمعیت‌های فوق‌الذکر است. زمان برآوردشده آغاز این اپیدمی سال ۱۹۹۰-۱۹۹۲ بود. به منظور کنترل موثر اپیدمی اچ‌آی‌وی، تدوین سیاست‌های پیشگیرانه در سطح منطقه‌ای ضروری بنظر می‌رسد. در این راستا، پیشنهاد می‌گردد افغانستان، ایران و پاکستان اقدام به تدوین برنامه‌های مشترک پیشگیری و کنترل اچ‌آی‌وی/ایدز نمایند. بهبود وضعیت شاخص‌های بهداشتی و اعمال مداخلات رفتاری میان جمعیت افغانستانی مقیم ایران نیز می‌تواند در کنترل اپیدمی و پیشگیری از موارد آتی انتقال موثر باشد. مدل رشد لجستیک پیشنهادکننده‌ی اثربخشی اقدامات پیشگیری و کنترل اچ‌آی‌وی در کشور است؛ هرچند نتایج برآورد اندازه‌ی جمعیت مبتلایان حاکی از کم‌شماری موارد مثبت می‌باشد. توالی‌های HIV-1B بدست آمده از ایران با توالی‌های آلمانی ارتباط اپیدمیولوژیکی نشان دادند. گرچه انتقال از آلمان به ایران ممکن است بصورت غیرمستقیم و از طریق کشورهای واسطه‌ای رخ داده باشد، بنظر می‌رسد تدوین استراتژی‌های پیشگیرانه نظیر مداخلات آموزشی برای رانندگان ترانزیت، تجار و توریست‌ها (که عمده‌ی تبادلات انسانی بین این دو کشور را برعهده دارند) در پیشگیری از ورود سویه‌های متنوع ویروس به کشور موثر باشد.

کلیدواژه‌ها: HIV-1؛ CRF35_AD؛ Subtype B؛ اچ‌آی‌وی؛ فیلوجغرافی؛ فیلودینامیک؛ فیلوژنتیک؛ کوآلت

نو ترکیبی؛ افغانستان؛ ایران

Abstract

Objective: HIV-1B (HIV-1B) and Circulating Recombinant Form 35_AD (CRF35_AD) have an important position in the epidemiological profile of Iran. In this study, we have followed a Bayesian phylogeographic approach to estimate for the first time, the onset date of these epidemics, their dissemination patterns, as well as their demographic history in Iran.

Method: We performed a secondary data analysis on Iranian CRF35_AD (*gag* and *pol*) and HIV-1B (*pol*) sequences available in the Los Alamos HIV database. Sequences were excluded if they showed evidences of incorrect subtype assignment, frameshift or drug resistance mutations, and/or stop codon positions. Subtype assignment was confirmed with maximum likelihood phylogenetic analysis. In order to reconstruct the spatio-temporal and demographic history of CRF35_AD and HIV-1B, we used discrete Bayesian phylogeographic model in BEAST v1.8.1. To test the between-country viral migration rates, a Bayesian stochastic search variable selection method was implemented in SPREAD v1.0.7. We estimated the population growth rate using the best-fitting logistic growth model, identified via path sampling and stepping stone sampling. We checked the robustness of the key parameter estimates through a sensitivity analysis, with different priors and data subsets.

Results: The data included worldwide samples of 496 CRF35_AD-like sequences (AlghD₁W=13, AlghD₁rHugHMLvlg ln 3D₁W=3, 'rD=440, 8 6A=1; Wp HVS=6-9 years) and 501 HIV-1B VHTHFHV('rD=12, A₁VF=167, (urPSH=156, 8 6A=166; Wne span=31 years). 1 f these samples, one HIV-1B and ten CRF35_AD sequences were removed due to drug resistance mutation. We did not observe any frameshift mutations and/or stop codon positions. Except the k orth American CRF35_AD sequence, subtype assignment of all other sequences was confirmed. The results showed that the CRF35_AD sequences have genetic similarity to parental sequences from h enya and r ganda (with Posterior Clade Credibility (PCC)> 0.7), and to a set of HIV-1A1 strains from Afghan refugees living in Pakistan (PCC= 0.9). Across all the phylogenies, Afghan and Iranian CRF35_AD sequences formed a monophyletic cluster (PCC> 0.7). The onset date of this epidemic was estimated to be 1990-1992 (95B Bayesian Credible Intervals (BCI): 1987-1994). Moreover, the CRF35_AD sequences from Afghan refugees living in Pakistan were epidemiologically linked to this epidemic (PCC> 0.7). Within this epidemic, we observed a bidirectional dispersion of the CRF35_AD between Afghanistan and Iran (dispersion rate= 1.0 migration event/year, 95B BCI: 0.01-3.5). Due to the similar age and diversity among Afghan and

Iranian CRF35_AD strains, we could not robustly estimate the country that first received or established this epidemic. Other key parameters, however, were robust in our sensitivity analysis. Results suggested a rapid, exponential growth of the CRF35_AD epidemic in Iran from its introduction in 1990-1992, followed by a decline in growth rate starting at 1995-2002 (growth rate = 0.1-0.3 /year; population doubling time = 2.3-4.8; effective population size = 5005.3-5130.2). Moreover, the results showed that the Iranian ϵ IV-1B strains were epidemiologically linked to the German ϵ IV-1B strains ($m_{CC} > 0.7$), and were introduced to the susceptible population since 1974 (95% BCI: 1966-1976). Due to the limited number of Iranian samples, demographic analyses were not performed on HIV-1B.

Conclusions: Our analyses suggested that the CRF35_AD viruses from Afghanistan, Iran, and Afghan refugees living in Pakistan constitute a single epidemic, with multiple genetic exchanges among these populations. The onset date of this epidemic (1990-1992) coincides with the rise of heroin production in Afghanistan (1970s). This highlights the potential role of the drug trafficking in epidemic ignition in this region. Mass migration of Afghan refugees and illegal workers to Iran may be other possible contributors in the between-countries viral exchange. For effective control of the ϵ IV epidemic in the region, it is recommended to develop ϵ IV/AIDS prevention and control programs at regional levels. In this regard, it is recommended that Afghanistan, Iran, and Pakistan define a set of joint ϵ IV/AIDS prevention and control policies. Improvement of healthcare measures and behavioural interventions targeting Afghan residents in Iran is also recommended. The best-fitting logistic growth model emphasizes the effectiveness of ϵ IV/AIDS prevention strategies in Iran, but the estimated effective population size of individuals suggests for an underreporting of ϵ IV cases in the country. On the other hand, the Iranian ϵ IV-1B strains were found to be epidemiologically linked to the German strains. The major human traffic between Iran and these countries consists of long-distance truck drivers, businesspeople, and tourists. Although these transmissions might be indirect, development of preventive strategies, such as educational interventions for these neglected groups seems to be effective in preventing the entrance of diverse ϵ IV forms into the country.

Keywords: ϵ IV; ϵ IV-1; subtype CRF35_AD; phylogenetic geography; phylodynamic; phylogenetic; Coalescence; Recombination; Afghanistan; Iran