


Resumo da Pós-Graduação da CCD/SES-SP

## Monitoramento da infecção pelo HIV-1: material de biorrepositório como fonte alternativa para a cultura e isolamento viral e estudo de sua evolução

Programa de Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), Secretaria de Estado da Saúde (SES-SP). São Paulo/SP, Brasil.

**Autor:** Cintia Mayumi Ahagon 

**Orientador:** Luís Fernando de M. Brígido

### Autor para correspondência

Cintia Mayumi Ahagon

E-mail: mayumiahagon@gmail.com

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Ciências (CCD/SES-SP)

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, nº 351, 1º andar. Sala 126. CEP: 01246-000. São Paulo/SP, Brasil

Monitoramento da infecção pelo HIV-1:  
material de biorrepositório como fonte alternativa para a cultura e isolamento viral e estudo de sua evolução

Ahagon CM, Brígido LFM (orientador)

A cultura do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi, no início da epidemia de aids, a primeira forma de diagnóstico. Com o desenvolvimento da sorologia e, posteriormente, dos testes moleculares, sua utilização para esse fim foi descontinuada. A produção de isolados virais, tanto para entender a dinâmica *in vitro* da infecção quanto para a obtenção de produtos a partir deles, é ainda uma área importante de pesquisa. No caso da produção de vírus para fins de produção de vacinas, a origem do isolado viral e as eventuais modificações durante o período de cultura podem ter impacto na avaliação de respostas. Neste estudo procuramos: i) reestabelecer os protocolos de isolamento viral; ii) avaliar o impacto desse cultivo na evolução genética *in vitro*; iii) avaliar o uso de materiais biológicos, entre os quais plasma e anel leucocitário, obtidos com anticoagulante EDTA e criopreservados na coleta, como alternativas ao método usual de isolamento a partir de células mononucleares de sangue periférico em heparina; e iv) testar alternativas mais simples de detecção do antígeno (Ag) viral no sobrenadante dessas culturas. Foram usados protocolos modificados WHO de cocultura utilizando meio de cultura RPMI, interleucina-2, soro fetal bovino, com adaptações para isolamento de outros materiais. A detecção do vírus no sobrenadante foi feita pela quantificação de carga viral, dosagem de Ag p24 (ELISA) e por detecção de Ag p24 por teste rápido. Um total de 26 amostras de 15 pacientes foi submetido à cultura. Foi realizado o sequenciamento parcial do gene *env* (Sanger) das amostras dos pacientes, antes e após a cultura, sendo avaliadas quanto à distância genética (MegaX), ao tropismo viral (*geno2pheno*), à taxa de substituição de nucleotídeos e aminoácidos, e à relação entre as sequências por meio de árvore filogenética. Foram obtidos isolados de plasma (1/2) e anel leucocitário (3/6) em EDTA congelados, e de coculturas padrão (1/5). Fitas de testes rápidos de quarta geração permitiram a detecção de Ag p24 em 11/17 sobrenadantes, a maioria positiva a partir da segunda semana de cultura. Nossos resultados documentaram que 2/16 das amostras apresentaram mudanças significativas nos valores de FPR, com mudança do tropismo de CCR5 para CXCR4. Houve evolução viral em quase todas as culturas realizadas, com média geral de mudança de nucleotídeos de  $4,7 \times 10^{-1}$ /dia de cultura (mínimo de 0, máximo 1,1) e de aminoácidos  $3,0 \times 10^{-1}$ /dia de cultura (mínimo de 0, máximo de  $6,7 \times 10^{-1}$ ); distância genética de  $2,4 \times 10^{-2}$  para aminoácidos (mínimo 0,00, máximo 3,55). Esses dados demonstraram a factibilidade do isolamento viral com materiais disponíveis em biorrepositórios e do uso de teste rápido como alternativas mais práticas e menos onerosas de detecção viral nessas culturas. Quanto à evolução observada, mesmo em culturas de curta duração, mudanças em diferentes aminoácidos podem ter impacto na resposta a produtos vacinais obtidos de culturas virais.

**PALAVRAS-CHAVE:** HIV-1, Diagnóstico laboratorial, Cocultivo, Taxa de mutação, Evolução viral.

### Histórico

Resumo do trabalho apresentado na Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da CCD/SES-SP realizada em: 08/10/2021. Publicação no BEPA: 08/06/2022

### Área de concentração

Vigilância em saúde pública




Monitoramento da infecção pelo HIV-1:  
material de biorrepositório como fonte alternativa para a cultura e isolamento viral e estudo de sua evolução

Ahagon CM, Brígido LFM (orientador)

Abstract from the Graduate Program at CCD-SES/SP

## HIV-1 Infection monitoring: Biorepository material as an alternative source for viral culture and isolation, and study of its development

Graduate Program in Sciences at CCD, Disease Control Coordination (DCC). State Health Department (SHD-SP). Sao Paulo/SP, Brazil.

**Author:** Cintia Mayumi Ahagon 

**Mentor:** Luís Fernando de M. Brígido

### Mailing

Cintia Mayumi Ahagon

E-mail: mayumiahagon@gmail.com

Institution: Graduate Program in Sciences (DCC/SHD-SP)

Address: Av. Doutor Arnaldo, nº 351, 1º andar. Sala 126. CEP: 01246-000. Sao Paulo/SP, Brazil

HIV-1 Infection monitoring:  
Biorepository material as an alternative source for viral culture and isolation, and study of its development

Ahagon CM, Brígido LFM (mentor)

Culturing the human immunodeficiency virus (HIV) was the first way of diagnosing aids in the beginning of the aids epidemic. Its use for that purpose was discontinued after the development of serology and, later on, molecular testing. The production of viral isolates, in order both to understand the in vitro infection dynamics and to obtain their derived products, is still important to research. When it comes to virus production aiming vaccine production, the origin of the viral isolate and any modifications during the period of culture may impact the response evaluation. In this study we sought to: i) reestablish viral culture protocols; ii) assess viral culture impacts on in vitro genetic development; iii) assess how biological materials, including plasma and leukocytes ring, obtained using EDTA anticoagulant and cryopreserved once collected, are used as alternative to the usual isolation method from peripheral blood mononuclear cells in heparin; and iv) test simpler alternatives for detecting viral antigen (Ag) in the supernatant from those cultures. We used modified WHO protocols for cocultures using RPMI growth medium, interleukin-2 (IL-2), fetal bovine serum (FBS), adjusted for isolating other materials. Virus in the supernatant were detected by viral load quantification, Ag p24 (ELISA) dosage, and Ag p24 rapid testing. A total of 26 samples from 15 patients were cultured. Env genes (Sanger) from patients' samples were partially sequenced, before and after culture, and analyzed for genetic distance (MegaX), viral tropism (geno2pheno), nucleotide and amino acid substitution rate, and the relationship between the sequences by phylogenetic tree. Frozen isolates of pla of Ag p24 in 11/17 supernatants, most of them positive from the second week of culture. Our results have documented that 2/16 of the samples showed significant changes in FPR values, having changed their tropism from CCR5 to CXCR4. There was viral development in almost all cultures, with an overall average nucleotide change of  $4.7 \times 10^{-1}$ /day of culture (minimum 0, maximum 1.1) and amino acid change of  $3.0 \times 10^{-1}$ /day of culture (minimum 0, maximum  $6.7 \times 10^{-1}$ ); and genetic distance of  $2.4 \times 10^{-2}$  for amino acids (minimum 0.00, maximum 3.55). These data have demonstrated the feasibility of viral culture using available materials in biorepository, as well as of rapid testing as more practical, less costly alternatives for viral detection in those cultures. As for the observed development, even in short-lived cultures, changes in different amino acids may have impacted the response to vaccine products that were obtained from viral cultures.

**KEYWORDS:** HIV-1, Laboratory diagnosis, Coculture, Mutation rate, Viral development.

**HISTORIC**

Abstract from the thesis submitted for Master's Defense within the Graduate Program in Sciences at CCD-SES/SP, defended on: 10/08/2021. Published on BEPA on: 06/08/2022.

**Area of concentration**

Surveillance in Public Health



HIV-1 Infection monitoring:  
Biorepository material as an alternative source for viral culture and isolation, and study of its development

Ahagon CM, Brígido LFM (mentor)