

## UTILIZAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS DE RIM DE HAMSTER PARA O ISOLAMENTO DO VÍRUS DA CAXUMBA (PAROTIDITE EPIDÊMICA)\*

Sueko TAKIMOTO \*\*  
Mário Monteiro de MESSAS \*\*\*  
Terezinha Maria de PAIVA \*\*  
Clélia Helena Oliveira MARTINEZ\*\*  
Tuneo ISHIMARU\*\*  
Elza Miyashiki MAKITA \*\*

RIALA6/561

TAKIMOTO, S.; MESSAS, M.M.; PAIVA, T.M.; MARTINEZ, C.H.O.; ISHIMARU, T. & MAKITA, E.M. — Utilização da cultura de células de rim de hamster para o isolamento do vírus da caxumba (parotidite epidêmica). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43:(1/2):81-84, 1983.

**RESUMO:** Cultura de células de linhagem contínua de rim de hamster (BHK-21) demonstrou ser um sistema mais sensível e mais rápido para o isolamento do vírus da caxumba, quando comparado com o de ovos embrionados de galinha. Estas células podem ser cultivadas sem dificuldade, em laboratório, ao contrário das células primárias de rim de macaco, igualmente sensíveis mas que são de difícil obtenção. A utilização de células BHK-21 para o isolamento do vírus da caxumba, do material biológico, constitui uma boa alternativa no diagnóstico das infecções causadas por esse vírus.

**DESCRIPTORIOS:** vírus da parotidite epidêmica (caxumba), isolamento; célula BHK-21, cultura, no isolamento do vírus da parotidite epidêmica (caxumba).

### INTRODUÇÃO

O cultivo do vírus da caxumba em cultura de células foi descrito pela primeira vez por WELLER & ENDERS<sup>9</sup>. Mais tarde, HENLE & DEINHARDT<sup>4</sup> descreveram a utilização da cultura de células para o isolamento deste vírus. UTZ *et alii*<sup>8</sup> descreveram métodos para o isolamento do vírus, no diagnóstico de laboratório, de uma variedade de material biológico e estudaram o efeito citopático por esse vírus em cultura de células. Estes autores demonstraram, ainda, que as células primárias de rim de macaco eram muito mais sensíveis que as células HeLa para o isolamento do vírus da caxumba. Já foram utili-

zadas, também, culturas de células primárias de rim de embrião e de âmnio humanos<sup>2</sup>.

Nós descrevemos um sistema eficiente para o isolamento do vírus da caxumba, que torna dispensável a utilização de cultura de células primárias de rim de macaco, opção bastante útil no diagnóstico de laboratório da caxumba.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Material biológico*

Foram objeto deste estudo líquido cefaloraquidiano e material de orofaringe de doentes atendidos no Hospital Emílio Ribas, com

\* Realizado na Seção de Vírus Respiratórios, Entéricos e Outros do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, e no Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Do Hospital Emílio Ribas.

suspeita de infecção por vírus da caxumba. O material foi transportado ao laboratório em gelo e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , até o momento de ser inoculado. A primeira amostra de soro desses pacientes, colhida na fase aguda da doença, era estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento em que era colhida a segunda amostra de soro, 15 dias após.

#### Isolamento do vírus

Culturas de células de Hep2 e BHK-21 foram multiplacadas em tubos contendo meio de Eagle mais 10% de soro de vitelo. Antes da inoculação do material biológico, as culturas eram lavadas três vezes com solução salina de Hanks. Como meio de manutenção foi utilizado o de Eagle ao qual se adicionou 2% de soro de galinha, inativado previamente a  $56^{\circ}\text{C}$ , por 30 minutos. A seguir foram utilizados dois tubos de células BHK-21 e dois tubos de células Hep2 e inoculados, em cada tubo, de 0,1 a 0,2 ml do material biológico e incubados em estufa a  $35^{\circ}\text{C}$ , durante 14 dias, trocando-se o meio a cada três dias. As culturas eram examinadas a cada dois dias ao microscópio ótico para verificar a presença de efeito citopático. O material era considerado como negativo quando não era verificado efeito citopático após três passagens sucessivas nessas culturas. No mesmo dia em que era realizada a inoculação do material biológico em cultura de células era feita, também, a inoculação na cavidade amniótica de ovos embrionados, de galinha, de 9 dias. Os ovos

inoculados eram deixados em incubação durante 4 a 5 dias, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, eram colhidos os líquidos amniótico e alantóico do ovo e verificada a presença de hemaglutinina. Eram feitas três passagens sucessivas de culturas suspeitas antes de serem consideradas como negativas.

#### Identificação do vírus

A identificação do vírus isolado foi feita através das reações de inibição de hemadsorção e/ou da inibição da hemaglutinação, conforme técnica descrita<sup>5</sup>, utilizando soros imune-específicos-padrão para os vírus da caxumba e da parainfluenza, tipos 1 a 4 (gentilmente cedidos pela Dra. M. S. Pereira, Virus Reference Laboratory, Colindale, London).

#### Reações sorológicas

Foi utilizada a reação de inibição da hemaglutinação para a dosagem de anticorpos em amostras pareadas de soros de doentes (fases aguda e convalescente), utilizando o vírus padrão da caxumba, estirpe Enders, conforme técnica já descrita<sup>5</sup>.

## RESULTADOS

O vírus da caxumba foi isolado de 9 entre 16 pacientes que apresentavam quadro clínico, variando, entre meningite, meningite mais parotidite, meningoencefalite e amigdalite (tabela 1).

TABELA 1

Resultado das tentativas de isolamento do vírus da caxumba em células BHK-21 e em ovos embrionados de galinha

Paciente	Idade (anos)	Sintomas associados	Isolamento do vírus			Elevação do título de anticorpos $\geq 4 \times$ (entre a fase aguda e de convalescença)
			Material	BHK-21	OEG	
FRMM	7	M+A	L	—	—	+
NJ	28	M+P	L e O	—	—	+
LOM	2	M+P	L e O	—	—	+
LAR	8	ME	L	+	—	+
ERS	12	M+P	O	—	—	+
MAP	11	M	L e O	—	—	+
JAP	18	M	L	—	—	+
RIS	12	M	L	+	+	—
JO	26	M+P	O	—	—	+
EJAC	8	M	L	+	—	+
CRS	—	M+P	O	+	—	—
RCS	14	M	L	+	—	—
MM	11	M+P	L	+	—	—
LAC	13	M+P	L	+	—	—
MCA	5	M+P	O	+	—	—
CJO	12	M	L	+	+	+

BHK-21 = linhagem contínua de células de rim de hamster; OEG = ovo embrionado de galinha; M+A = meningite mais amigdalite; M+P = meningite mais parotidite; ME = meningoencefalite; M = meningite; L = líquor; O orofaringe.  
+ = positivo.  
— = negativo.

Observou-se, em cultura de células de BHK-21 infectada com vírus da caxumba, efeito citopático característico, com formação de células multinucleadas sinciciais e de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, a partir do quarto dia após a inoculação do material biológico. As células infectadas adsorveram hemácias de galinha e de cobaia. A hemadsorção foi inibida por soro imune específico para o vírus da caxumba.

Foram isolados vírus da caxumba de nove casos em cultura de células de BHK-21 e de dois casos em ovos embrionados de galinha. Em BHK-21, com a exceção de três casos em que foram detectados vírus na segunda passa-

gem, a presença de vírus foi observada na primeira passagem, geralmente no 4.º dia após a inoculação do material biológico. No entanto, a presença do vírus no líquido amniótico do ovo só foi detectada na segunda e na terceira passagem. Isso demonstra que BHK-21 é muito mais sensível que ovo embrionado para o isolamento do vírus da caxumba (tabela 2).

Todas as vezes em que o material clínico era inoculado em BHK-21 e em ovo embrionado, era feita também inoculação em Hep2. No entanto, em nenhuma das vezes esse vírus da caxumba foi isolado em Hep2, o que demonstra a insensibilidade dessa célula para esse vírus.

TABELA 2

*Comparação da sensibilidade entre células BHK-21 e ovo embrionado de galinha para o isolamento do vírus da caxumba*

OEG	Casos positivos		Casos negativos	Total de casos
	1.ª passagem	2.ª passagem		
Casos positivos 2.ª passagem	1	—	—	1
Casos positivos 3.ª passagem	—	1	—	1
Casos negativos	5	2	7	14
Total de casos	6	3	7	16

## DISCUSSÃO

Estudos anteriores já demonstraram que as células primárias de rim de macaco são as mais sensíveis para o isolamento do vírus da caxumba do material biológico e são as mais comumente utilizadas para essa finalidade<sup>4, 8</sup>. No entanto, há uma resistência crescente quanto à utilização dessa cultura de células, em Virologia, por causa da extinção progressiva da espécie. Infelizmente não foi possível fazer uma comparação da sensibilidade entre BHK-21 e células primárias de rim de macaco ao vírus da caxumba, pela impossibilidade de se obter esse tipo de células no laboratório. Mesmo assim, foi possível constatar que BHK-21 é bastante sensível e que apresenta a grande vantagem sobre a cultura primária de rim de macaco de poder ser mantida em qualquer laboratório de Virologia, além de ser pouco onerosa.

A importância de ter sido encontrado um sistema sensível ao isolamento primário do vírus da caxumba atinge maior proporção se

for levado em consideração que, para a realização do diagnóstico sorológico, são necessárias duas amostras de sangue de um mesmo paciente, colhidas em intervalo de 15 dias. A infecção por esse vírus através da tentativa de isolamento em BHK-21 pode ser detectada no quarto dia após a inoculação do material clínico e independe do retorno do paciente para a coleta da segunda amostra de sangue.

Por causa da relação antigênica existente entre vírus da caxumba e outros vírus do grupo dos paramixovirus<sup>1, 7</sup>, e uma vez que o vírus da caxumba pode causar comprometimento neurológico sem que haja necessariamente um comprometimento visível das parótidas<sup>3, 6</sup>, em casos de doença neurológica, os resultados sorológicos devem sempre ser interpretados em conjunto com a informação clínica e com o isolamento do vírus do líquor. A utilização do sistema BHK-21 para o isolamento do vírus da caxumba é uma excelente opção em laboratórios com recursos mais limitados em que não é possível obter células primárias de rim de macaco.

TAKIMOTO, S.; MESSAS, M.M.; PAIVA, T.M.; MARTINEZ, C.H.O.; ISHIMARU, T. & MAKITA, E.M. — Utilização da cultura de células de rim de hamster para o isolamento do vírus da caxumba (parotidite epidêmica). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):81-84, 1983.

RIALA6/561

TAKIMOTO, S.; MESSAS, M.M.; PAIVA, T.M.; MARTINEZ, C.H.O.; ISHIMARU, T. & MAKITA, E.M. — Cultures of hamster kidney cells in the isolation of mumps virus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):81-84, 1983.

ABSTRACT: Continuous-line cultures of hamster kidney cells (BHK-21) was found to be a more rapid and sensitive procedure for isolation of mumps virus as compared with the embryonated chicken egg procedure. BHK-21 cells can be easily maintained in the virus laboratory, thus contrasting with similarly sensitive primary cells of monkey kidney which are difficult to obtain and cannot be maintained. Use of BHK-21 cell cultures for the isolation of mumps virus seems to be a useful alternative procedure.

DESCRIPTORS: mumps virus, isolation in BHK-21 cell culture; cell, BHK-21 cell culture in the isolation of mumps virus; epidemic parotitis virus; myxovirus parotitidis.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COOK, M.K.; ANDREWS, B.E.; FOX, H.H.; TURNER, H.C.; JAMES, W.D. & CHANOCK, R.M. — Antigenic relationships among the "newer" myxoviruses (para-influenza). *Amer. J. Hyg.*, 69:250-64, 1969.
2. COONEY, M.K.; FOX, J.P. & HALL, C.E. — The Seattle virus watch. VI. Observations of infections with and illness due to parainfluenza, mumps and respiratory syncytial viruses and *mycoplasma pneumoniae*. *Amer. J. Epidemiol.*, 101:532-51, 1975.
3. HENLE, G.; HENLE, W.; WENDELL, K.K. & ROSENBERG, P. — Isolation of mumps virus from human beings with induced apparent or inapparent infections. *J. exp. Med.*, 88:223-32, 1948.
4. HENLE, G. & DEINHARDT, F. — Propagation and primary isolation of mumps virus in tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 89:556-60, 1955.
5. HOOPS, H.E. & PARKMAN, P.D. — Mumps virus. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, H.J. — *Diagnostic procedure for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, A.P.H.A., c1979, p. 633-53.
6. KILHAM, L. — Mumps meningoencephalitis with and without parotitis. *Amer. J. Dis. Child.*, 78:324-33, 1949.
7. LENNETTE, E.H.; JENSEN, F.W.; GUENTHER, R.W. & MAGOFFIN, R.L. — Serologic responses to para-influenza viruses in patients with mumps virus infection. *J. Lab. clin. Med.*, 61:780-88, 1963.
8. UTZ, J.P.; KASEL, J.A.; CRAMBLETT, H.G.; SZWED, C.F. & PARROTT, R.H. Clinical and laboratory studies of mumps. I. Laboratory diagnosis by tissue-culture technics. *New. Engl. J. Med.*, 257:497-502, 1957.
9. WELLER, T.H. & ENDERS, J.F. — Production of hemmagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue culture. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 69:124-8, 1948.

Recebido para publicação em 12 de maio de 1983.