

ACTA MEDICA IRANICA

Vol. XXI. 1978, P.129-140

Sensibilité Comparée de Quatre Cultures
Cellulaires Différentes Pour L'Isolement
et L'Identification de Virus des Oreillons

Fakhrossadat Mohammadzadeh Kiai

Dans les infections à virus des oreillons, une méningite déclarée peut survenir en moyenne dans 10% des cas, avant, pendant ou après la parotidite (1-7-8-). Elle peut aussi constituer la seule manifestation cliniquement apparente de la maladie (7). Surtout dans ce dernier cas, il est impossible de poser sans équivoque un diagnostic étiologique de la maladie. Même en présence d'une parotidite, la responsabilité de virus des oreillons comme l'agent en cause, est une présomption et non pas une certitude, car parotidite suppurée dans les affections à streptocoques de la gorge, dans la diphtérie ou la fièvre typhoïde.

Syndrome de Mikuliez (parotidite chronique afebrile).
Furoncle du canal auditif externe et adenite cervicale .
Tumeur malignes des glandes salivaires . Obstruction du canal de sténon par un calcul. Périostite du maxillaire inférieur, peuvent être confondu avec une parotidite our-

Department de Microbiologie et D'Immunologie de la
Faculté des Sciences de Base Médicales Université de
Theran Iran

lienne (10). Le diagnostic étiologique d'une parotidite ou bien d'une méningite ourlienne est donc parfois impossible sans l'aide d'examen de laboratoire. Le diagnostic sérologique, par les méthodes de fixation du complément et l'inhibition de l'hémagglutination, implique la titration des anticorps dans des prélèvements précoces et tardifs de sérum du malade, obtenus dans un intervalle de 15 Jours. Pour arriver à un diagnostic rapide, de façon à exclure l'étiologie bactérienne de la maladie en cas d'une méningite ourlienne l'isolement du virus pourrait présenter un intérêt capital. D'après la littérature, les cultures cellulaires en lignées continues de Hela, Hep-2 et la primoculture de rein de singe seraient les plus convenables pour l'isolement du virus.

Au cours des travaux routines de laboratoire concernant l'isolement du virus à partir de différents produits pathologiques nous avons constaté que la lignée cellulaire Vero permet le plus fort pourcentage d'isolement de virus des oreillons, ce qui nous a incité à reprendre une étude de la valeur comparée, sur la sensibilité de primoculture cellulaire de rein embryonnaire humain et trois différentes cultures cellulaires en lignées continues (Hela, Am57 et Vero), pour l'isolement et l'identification de virus des oreillons. Les résultats obtenus de cette investigation font l'objet de la présente note.

Matériel et méthodes

1- Les cultures cellulaires.

Nous avons comparé la sensibilité de quatre cultures cellulaires différentes à l'égard de virus des oreillons:

a- Les lignées cellulaires.

Il- s'agit des lignées cellulaires Hela(3), Am57(6) et Vero (5-9). Depuis plus de 8 ans ces cellules ont été main-

tenues dans notre laboratoire, dans un milieu à base d'hydrolysate de caséine (4) préparé par nous-mêmes.

b- Les primocultures de rein embryonnaire humain.

Elles sont obtenues par trypsination selon la méthode habituelle et cultivées dans du milieu d'hydrolysate de caséine(4).

2- Produits pathologiques examinés.

Deux catégories de produits pathologiques ont été testés sur quatre systèmes cellulaires précités:

a- La salive.

On a fait cracher les enfants soupçonnés d'une infection ourlienne dans un récipient stérile. Les salives ainsi recueillies sont ensuite additionnées de 500 unités de pénicilline, 250 microgrammes de streptomycine, 100 unités de mycostatine par ml et placées pendant une heure à 37°C.

b- Liquide céphalo-rachidien.

Nous avonsensemencé tel quel, soit les liquides céphalo-rachidiens provenant d'enfants atteints d'une méningite aseptique post oreillons, soit le reste des L.C.R. à partir desquels un virus ourlien avait été préalablement isolé.

3- Ensemencement parallèle de chaque produit pathologique sur quatre systèmes cellulaires à comparer.

Les liquides céphalo-rachidiens ainsi que les salives ont étéensemencés dans les délais les plus brefs après leur arrivée au laboratoire. Ils sont inoculés à raison de 0.2 ml. par tube et à deux tubes de chaque système cellulaire dont le milieu avait été préalablement remplacé par un milieu d'entretien d'entretien neuf. Les cultures cellulaires ainsiensemencées sont placées à 36°C. et examinées après 48 heures, puis régulièrement tous les jours. Les cultures cellulaires inoculées sont suivies pendant 14 jours. Durant l'observation on note les cultures cellulaires permettant la

croissance de virus.

4- Identification des virus isolés.

En vue d'orienter l'identité de virus isolé, on a tout d'abord procédé à une étude précise de type d'effet cytopathique, observé à l'état frais et sur préparations colorées. La confirmation de l'identité soupçonnée de virus est ensuite apportée par une épreuve de séroneutralisation avec l'antisérum spécifique de virus ourlien.

Resultats

Ayant pour but de comparer la sensibilité de quatre cultures cellulaires différentes pour l'isolement de virus des oreillons à partir de divers produits pathologiques, nos essais ont porté sur 46 prélèvements de la salive et 25 liquides céphalo-rachidiens provenant d'enfants soupçonnés d'une parotidite ou méningite ourlienne. Dans des conditions identiques, l'inoculation simultanée de chaque produit pathologique aux quatre systèmes cellulaires a révélé la valeur appréciable de culture cellulaire Vero pour l'isolement et l'identification de virus des oreillons, dans un laboratoire de diagnostic virologique.

En effet cette lignée cellulaire nous a permis 24 fois l'isolement de virus ourlien, tandis que à partir des mêmes prélèvements, les cultures cellulaires Am 57, Hela et le rein embryonnaire humain, ont donné respectivement 19, 17 et 3 fois des résultats positifs concernant la multiplication virale (Tableau I).

Effectuant la titration de virus des oreillons sur les cultures cellulaires en comparaison, les cellules Vero ont fourni des titres en virus infectieux sensiblement plus élevés par rapport aux trois autres cultures cellulaires, lorsque la récolte virale est faite sur le surnageant cellulaire, 72 heures après infection (tableau II). En outre, l'

Tableau I.

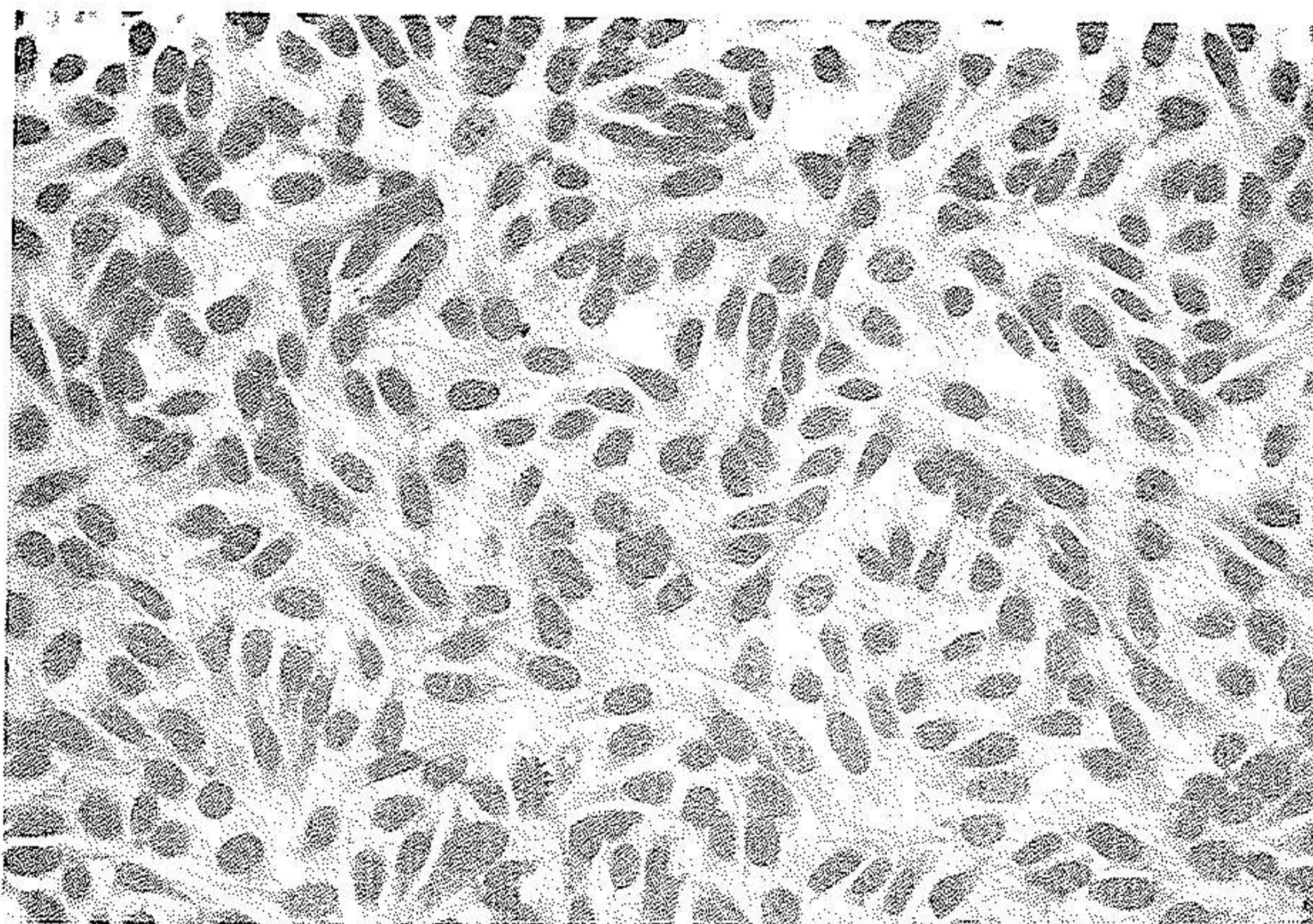
Nature de prélèvement	Nombre de prélèvements	Cultures cellulaires permettant la croissance de virus ourlien		
		Vero	AM 57	Hela R.E.H.*
Salive	46	18	16	13
L.C.R.*	25	6	3	4
Totaux	71	24	16	17

* L.C.R. = Liquide céphalo-rachidien
R.E.H. = Rein embryonnaire humain

Tableau II.

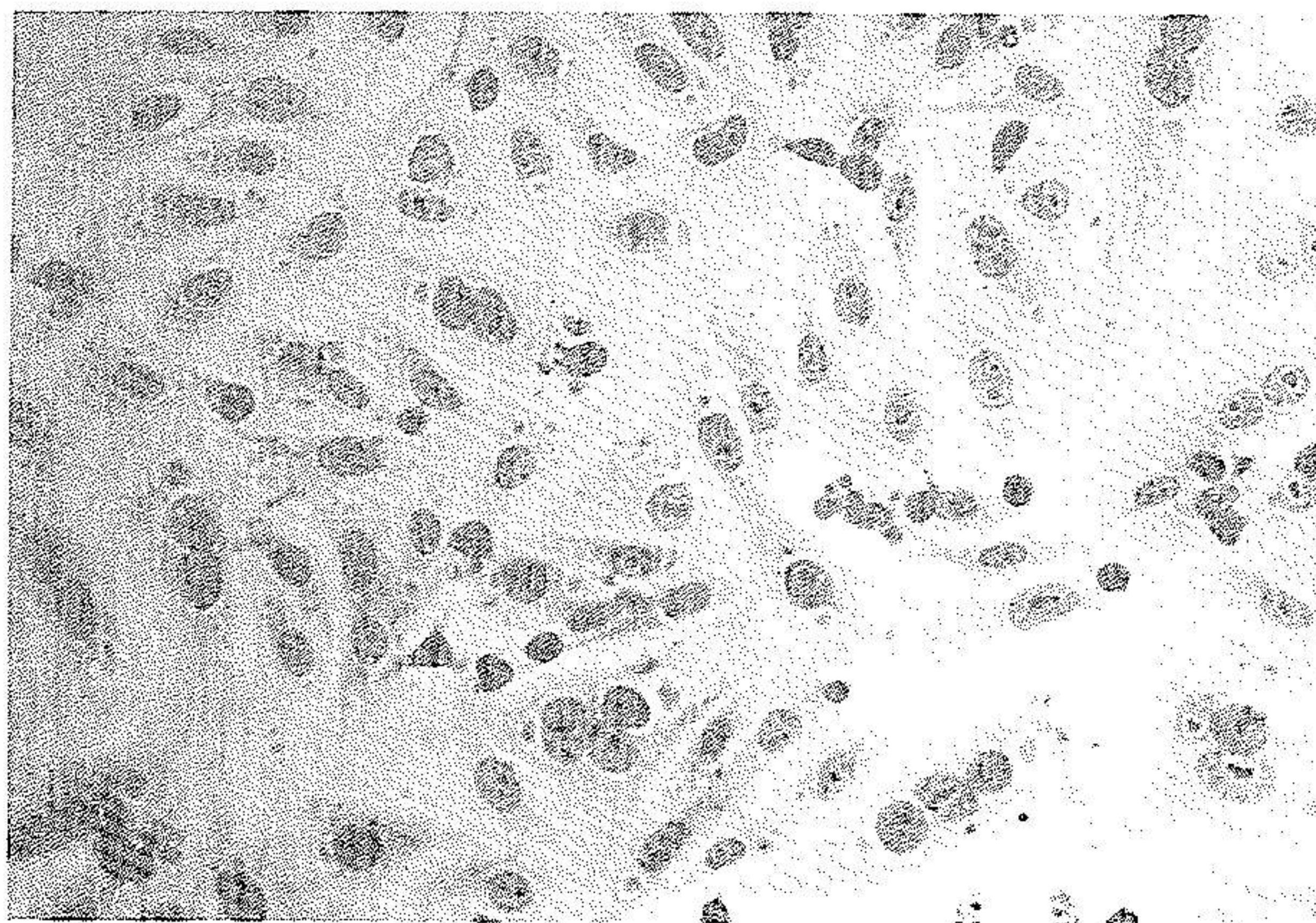
Cultures Cellulaires	Semence (cell./ml.)	Milieu de croissance	Jours pour culture confluent	Log. de DICT/50 de virus ourlien
Vero	2×10^4	H. C.*	3 - 4	3.5
AM 57	2×10^4	"	4 - 5	2
Hela	2×10^4	"	3 - 4	1.75
R.E.H.	4×10^5	"	6 - 8	1.25

* H.C.: Hydrolysat de caseine.



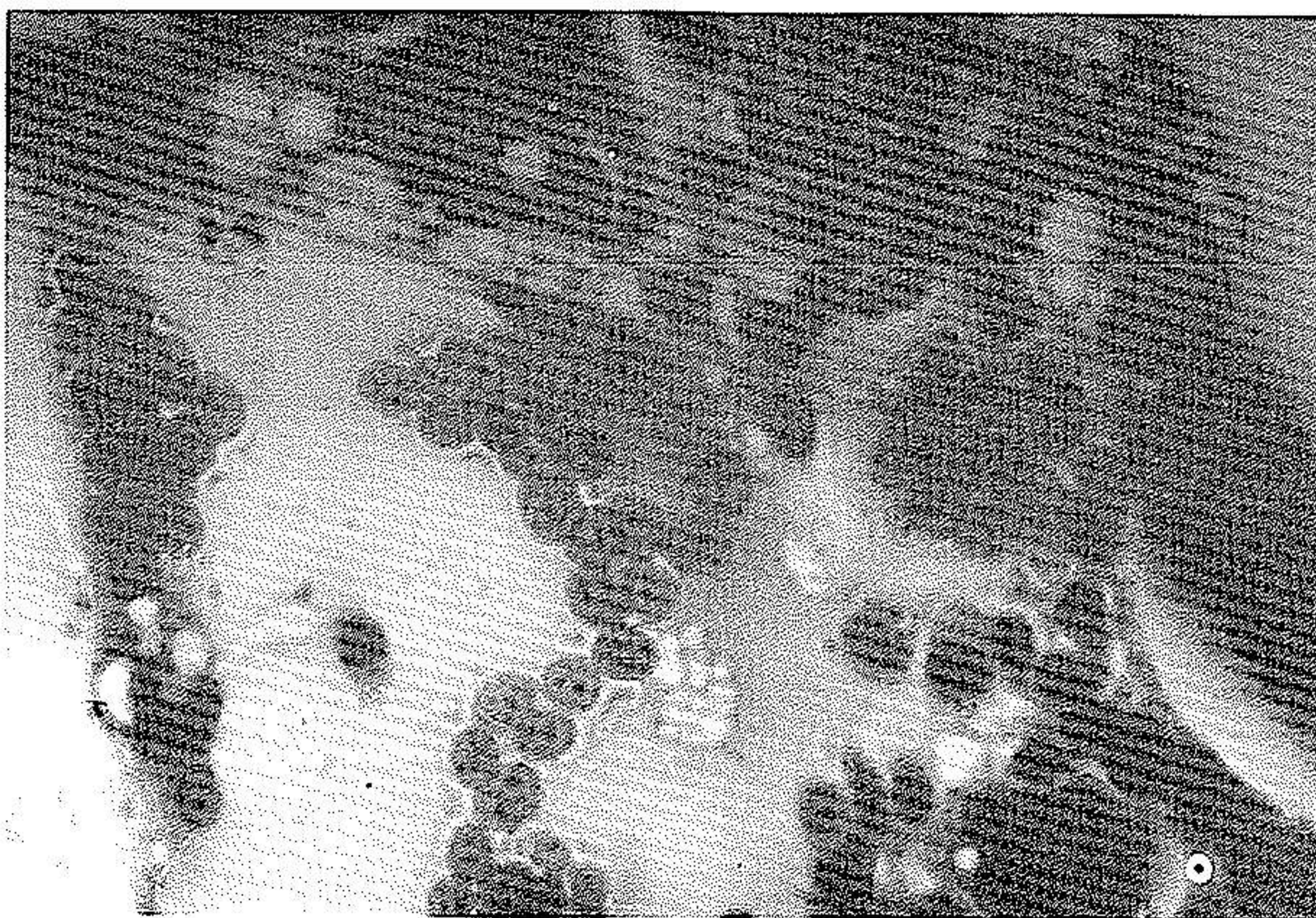
Cliché 1

Cellules Vero normales



Cellules Vero 48 heures après l'infection avec le virus des oreillons.
Voir multiple inclusions intracytoplasmiques acidophiles.

aspect d'effet cytopathique de virus des oreillons sur cellules Vero, observé a l'état frais et sur préparations colorées est, plus évocateur de ce virus qu'il ne l'est sur d'autres cellules étudiées. En fait, comme on peut le voir dans les clichés 2 et 3, 48 heures après infection, de nombreuses inclusions intracytoplasmiques acidophiles apparaissent dans les cellules et au bout de 72 heures on assiste à la formation de volumineux syncytiumes caractérisés par une intense vacuolisation (cliché 3).



Cliché 3

Cellules Vero 72 heures après l'infection avec le virus des oreillons.
Voir volumineux syncytiumes avec une intense vacuolisation.

Discussion

L'importance de diagnostic rapide d'une infection ourlienne par les méthodes de laboratoire réside surtout dans le fait qu'on peut exclure l'étiologie bactérienne de la maladie en cas de méningites causées par le virus des oreillons. En outre, si le diagnostic clinique d'une infection lienne chez des sujets représentant la tumefaction parotidienne bilatérale, en cours d'une épidémie, est relativement facile, il est par contre très difficile devant les parotidites unilatérales ou bilatérales atypiques d'origine viral (Coxsackie A et chorio-méningite lymphocytaire), bactérienne ou bien d'autres facteurs que nous avons déjà mentionnés dans l'introduction de cet article. Dans les infections ourliennes, lorsque les signes d'atteinte salivaire ou testiculaire sont absents et lorsque la méningite constitue la seule manifestation de la maladie, l'isolement de virus à partir de la salive, le L.C.R. ou bien de l'urine pourrait présenter le moyen de diagnostic le plus rapide. Pour ce faire le choix de culture cellulaire constitue un facteur essentiel. Les primocultures de rein de singe, les cultures cellulaires en lignées continues de Hela et Hep-2 sont recommandées. Les primocultures de rein de singe n'étant pas toujours accessibles, surtout pour les petits laboratoires de virologie, on recourt à l'utilisation de cultures cellulaires en lignées continues pour l'isolement de virus des oreillons. D'après cette étude, la lignée cellulaire Vero retient l'attention en raison de sa grande sensibilité à l'égard de virus ourlien, la facilité avec laquelle on peut l'entretenir et notamment son extraordinaire faculté de survie dans des conditions défavorables, en fait dans un autre travail nous avons démontré qu'on peut conserver les

cellules Vero 26 mois a 36°C. sans renouvellement du milieu d'entretien (2).

Rappelons enfin que contrairement à ce qu'on voit à travers la littérature, les primocultures de rein embryonnaire humain nous ont permis le moindre pourcentage d'isolement de virus des oreillons.

Resumé

Trois différentes cultures cellulaires en lignées continues (Am 57, Hela, Vero) et la primoculture cellulaire de rein embryonnaire humain ont été comparées à l'égard de leur sensibilité pour l'isolement de virus des oreillons à partir de la salive et celui du liquide céphalo-rachidien. Pour ce but, la lignée cellulaire Vero s'est avérée la plus convenable parmi les systèmes cellulaires étudiés à cause des raisons suivantes: elle permet le plus fort pourcentage d'isolement de virus des oreillons. L'effet cytopathique de virus ourlien, comparativement se manifeste dans un délai plus court sur culture cellulaire Vero. Cet effet cytopathique est assez caractéristique pour permettre un diagnostic préliminaire de virus des oreillons.

Summary

Three differentes continous cell lines (Am 57, Hela , Vero) and primary cell culture of human embryo kidney are compared with regard to their susceptibility for isolation of mumps virus from saliva and cerebrospinal fluid. For this purpose the Vero cell line appeared to be more suitable among the studied cell systems regarding the following reasons: it allows the highest pourcentage of mumps virus isolation. The cytopathic effect caused by mumps virus occurs comparatively rapidly in this cell culture. This cytopathic effect is typical enough to allow for a preliminary diagnosis of mumps virus.

Bibliographie

- 1- Azimi, P.H., Cramblett, H.G. and Haynes, R.E. (1969). Mumps meningoencephalitis in children. *J. Am. Med. Ass.*, 207, 509
- 2- Farrohi, Kh. et Mohammadzadeh-Kiai, F. (1975). Conservation prolongée des lignées cellulaires à 36 C. sans renouvellement du milieu d'entretien. *Bull. Soc. path. Ex.*, 68, 603
- 3- Gey, G.O. (1933). An improved technique for massive tissue culture. *Am. J. Cancer*, 17, 725
- 4- Lépine, P., Slizewicz, P., Daniel, P. et Paccaud, M. (1956). Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caséine comme source d'acides aminés. *Ann. Inst. Pasteur*, 90, 654
- 5- Macfarlane, D.E. and Sommerville, R.G. (1969). vero cells (*Cercopithecus Aethiops* Kidney) growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. *Arch. Virusforsch.* 27, 379
- 6- Mayer, V., Mayerova, A. and Vilcek, J. (1959). Some aspects of the use of a transformed line of human amniotic cells in virological work. *Acta Virol.* 3 (suppl.), 51
- 7- Radl, H. (1969). The importance of mumps meningitis. *Dt. Med. Wschr.*, 94, 1599
- 8- Wolontis, S. and Bjorvat, B. (1974). Mumps meningoencephalitis in Stockholm. *Scand. J. Infect. Dis.*, 6, 13
- 9- Yasamura, Y. and Kawakita, Y. (1963). Research into SV40 by tissue culture. *Nippon Rinsho.* 21, 1201
- 10- Zollar, L.M. and Mufson, M.A., (1970). Parotiditis of non-

mumps etiology.

Hosp . Pract. August 1970 , 93