

# Comparación entre las líneas celulares LLC-MK2 y MDCK en el aislamiento del virus parainfluenza a partir de aspirados nasofaríngeos

Jordi Reina, Joan Saurina, Maria Munar e Isabel Blanco

Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.

**FUNDAMENTO:** El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio prospectivo comparativo sobre la eficacia de tres líneas celulares comerciales en el aislamiento del virus parainfluenza (PI) a partir de aspirados nasofaríngeos.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Durante un período de 16 meses se han estudiado comparativamente todos los aspirados nasofaríngeos procedentes de pacientes con sospecha de infección respiratoria viral. Las líneas celulares comparadas han sido la LLC-MK2 y la MDCK. Todas las muestras se han procesado mediante el cultivo celular en *shell-vial*, incubado durante 3 días a 36 °C y revelado mediante una inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la nucleoproteína del virus de la PI.

**RESULTADOS:** A lo largo del estudio se han analizado 746 aspirados nasofaríngeos, aislándose 46 cepas del virus PI serotipo 3. La línea LLC-MK2 ha aislado 44 cepas (95,6%) frente a 41 (89,1%) de la MDCK, no observándose diferencias estadísticas en la sensibilidad cualitativa ( $p = 0,14$ ) (sensibilidad cualitativa). En el 84,8% de los casos las cepas crecieron en ambas líneas celulares. Ninguna línea celular permitió el aislamiento de todas las cepas. Tampoco se han observado diferencias en la sensibilidad cuantitativa, aunque la línea LLC-MK2 permitió el aislamiento de un porcentaje ligeramente superior (el 70,4 frente al 68,2%) de muestras con bajo inóculo.

**CONCLUSIONES:** A la vista de los resultados obtenidos parece posible la utilización de cualquiera de estas dos líneas celulares en el aislamiento del virus de la PI de muestras respiratorias.

**Palabras clave:** Virus parainfluenza. Línea celular LLC-MK2. Línea celular MDCK. Diagnóstico de infección respiratoria viral.

Comparison between the LLC-MK2 and MDCK cell lines in the isolation of the parainfluenza virus from nasopharyngeal aspirates

**BACKGROUND:** We report a prospective comparative study of the efficacy of three commercial cell lines in the isolation of the parainfluenza (PI) virus from nasopharyngeal samples.

**MATERIAL AND METHODS:** In a 16 months period we studied all nasopharyngeal samples from patients with the suspicion of a viral respiratory infection. The compared cell lines were LLC-MK2 and MDCK. All samples were processed by the shell-vial assay, incubated 3 days at 36 °C. The monolayers were stained by an indirect immunofluorescence assay with a monoclonal antibody against the nucleoprotein of the PI virus.

**RESULTS:** In the study period 746 samples were analyzed, 46 PI virus were isolated, all belonged to the serotype 3. The LLC-MK2 cell line isolated 44 viruses (95.6%) and the MDCK cell line 41 (89.1%), no statistically significant differences were detected ( $p = 0.14$ ) (qualitative sensitivity). In 84.8% of positive samples, the PI virus was isolated simultaneously in the two cell lines. Neither cell line isolated all PI virus. No statistical differences were detected in the quantitative sensitivity, although the LLC-MK2 cell line detected a slightly more samples with a low viral load (70.4 vs 68.2%).

**CONCLUSIONS:** In view of the results obtained in this study, we believe that anyone of the two cell lines would be used in the isolation of the PI virus from respiratory samples.

**Key words:** Parainfluenza virus. Cell line LLC-MK2. Cell line MDCK. Diagnosis of respiratory viral infections.

## Introducción

Las infecciones virales del tracto respiratorio inferior constituyen una de las principales causas de morbilidad en la población pediátrica, especialmente en los niños de menos de 6 meses de edad<sup>1,2</sup>. De los diferentes virus implicados en esta entidad, el virus respiratorio sincitial y el virus parainfluenza (PI) constituyen cerca del 90% de los agentes etiológicos aislados en estos pacientes. El virus PI es el causante del 5-15% de las infecciones virales respira-

Correspondencia: Dr. J. Reina.  
Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica.  
Hospital Universitario Son Dureta.  
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.

Manuscrito recibido el 15-1-1997; aceptado el 5-3-1997.

*Enferm Infecc Microbiol Clín* 1997; 15: 422-424.

torias en este grupo de edad, siendo, además, el serotipo 3 el más frecuentemente aislado en esta enfermedad infecciosa<sup>1,3,4</sup>.

Los primeros estudios realizados sobre el aislamiento del virus PI en cultivos celulares demostraron que el cultivo primario del riñón de mono *rhesus* presentaba el mayor rendimiento diagnóstico, permitiendo el aislamiento de la mayoría de cepas<sup>5</sup>. Sin embargo, las dificultades existentes en su obtención y tratamiento obligaron a la búsqueda de líneas celulares continuas que permitieran el crecimiento de este virus. Así, se pudo comprobar cómo la línea derivada de riñón de perro, descrita por Madin y Darby (línea MDCK)<sup>6,7</sup> y la línea continua derivada de riñón de mono *rhesus* (línea LLC-MK2) permitían el aislamiento y crecimiento del virus PI<sup>5-8</sup>. Un dato fundamental en la utilización de estas líneas celulares es que para la obtención del máximo rendimiento diagnóstico es preciso añadir tripsina al medio de mantenimiento del cultivo<sup>6-8</sup>.

Desde el estudio de Frank et al<sup>8</sup> realizado con cultivos celulares convencionales (cultivos en tubo) no se ha comunicado ningún otro estudio comparativo posterior utilizando la técnica de cultivo en *shell-vial*, por ello hemos realizado un estudio comparativo prospectivo sobre la eficacia de las líneas celulares LLC-MK2 y MDCK en el aislamiento del virus PI en muestras clínicas.

## Material y métodos

Durante un período de 16 meses (enero 1995-abril 1996) se han estudiado todas las muestras respiratorias (aspirados nasofaríngeos) enviados al laboratorio para el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales.

Cada muestra fue homogeneizada con 3 ml de suero fisiológico hasta la obtención de una suspensión densa. Para el cultivo celular en *shell-vial* se tomaron 200 µl de la muestra y fueron inoculados en dos viales de las líneas celulares LLC-MK2 y MDCK (Vircell, Ingelheim Diagnostica). Los viales fueron centrifugados a 700 g durante 45 min, tras lo que se dejaron reposar a 36 °C durante 60 min. Se decantó el sobrenadante y fue sustituido por 1 ml de medio de mantenimiento compuesto por MEM (*minimal essential medium*) con un 1% de suero bovino fetal y 2 µg/ml de tripsina. Los viales se incubaron durante 3 días a 36 °C y fueron posteriormente teñidos mediante una inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la nucleoproteína del virus PI (clon 5/12) (Monofluokit P.I.3, Diagnostics Pasteur, Francia).

Se consideraron dos tipos de positividad: la cualitativa (presencia de células con fluorescencia específica) y la cuantitativa o número de focos infectivos presentes en cada una de las monocapas de cada línea celular.

## Resultados y discusión

A lo largo del período de estudio se han analizado 746 muestras, siendo consideradas como positivas (aislamiento de virus) 359 (48,2%). En 46 casos se aisló el virus PI. Todas las cepas pertenecían al serotipo 3. La incidencia de infección por este virus ha sido del 6,1% sobre la totalidad de pacientes estudiados y del 12,8% de aquellos con cultivo viral positivo.

En el estudio de la sensibilidad cualitativa, la línea LLC-MK2 permitió el aislamiento de 44 cepas (95,6%) frente a 41 (89,1%) de la MDCK, no observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,14$ ) (tabla 1). En el 84,8% de las muestras el virus PI se aisló de forma si-

TABLA 1. Resultados globales obtenidos en la comparación de las dos líneas celulares

Líneas celulares		Número
LLC-MK2	MDCK	
+	+	39 (84,8)
+	-	5 (10,8)
-	+	2 (4,4)
44 (95,6)	41 (89,1)	46

Las cifras entre paréntesis expresan el porcentaje.

TABLA 2. Evaluación de las tres líneas celulares en función del número de focos infectivos observados en la monocapa

Número de focos infectivos	Líneas celulares	
	LLC-MK2	MDCK
1-10	31 (70,4)	28 (68,2)
11-25	10 (22,7)	10 (24,4)
> 26	3 (6,8)	3 (7,3)
	44	41

Las cifras entre paréntesis expresan el porcentaje.

multánea en las dos líneas celulares. Ninguna de las dos permitió el aislamiento de la totalidad de las cepas.

En cuanto a la sensibilidad cuantitativa (tabla 2) tampoco se han observado diferencias significativas entre las dos líneas celulares y el número de focos infectivos detectados en éstas. En los 5 casos sólo aislados en la línea LLC-MK2, tres muestras presentaron entre 1-10 focos infectivos y dos entre 11-26 focos infectivos. En los 2 casos solamente aislados en la línea MDCK los recuentos fueron bajos, entre 1-10 focos infectivos, en ambos casos.

Los primeros estudios realizados por Frank et al<sup>8</sup> confirmaron la mayor eficacia de la línea celular continua LLC-MK2 en el aislamiento del virus PI de muestras clínicas frente a la línea MDCK, preferentemente recomendada para el aislamiento del virus de la influenza<sup>8,9</sup>. Desde ese momento, la mayoría de laboratorios utilizan de forma rutinaria la línea celular LLC-MK2 para el aislamiento del virus PI de muestras respiratorias humanas<sup>2,10</sup>.

La introducción de los sistemas rápidos de cultivo celular poscentrifugación o en *shell-vial* en las muestras respiratorias ha permitido acortar el tiempo necesario para la realización del diagnóstico e incrementar el rendimiento y especificidad de los mismos. La utilización del sistema en *shell-vial* para el aislamiento del virus PI ha mostrado una sensibilidad muy similar a la del cultivo convencional con una mayor rapidez y especificidad en el diagnóstico<sup>11,12</sup>.

En nuestro estudio comparativo las dos líneas celulares han presentado prácticamente la misma eficacia en el aislamiento del virus PI de aspirados nasofaríngeos. Por ello creemos que puede ser utilizada de forma rutinaria cualquiera de las dos, dado que no hemos obtenido diferencias estadísticamente significativas ni en la sensibilidad cualitativa ni en la cuantitativa. Los porcentajes de aislamiento obtenidos por nosotros son muy similares a los obtenidos por Brumback y Wade<sup>12</sup>, un 95% de aislamientos en la línea LLC-MK2, y algo superior al 79% obtenido por estos autores en la línea MDCK. Ninguna de las dos líneas celulares ha permitido el aislamiento de la totalidad de las ce-

pas, lo cual podría deberse a la presencia de un inóculo viral muy bajo en la muestra o a una distribución no homogénea entre los dos viales.

A pesar de ello, la línea primaria de riñón de mono sigue siendo la de referencia para el aislamiento de las cepas del virus PI a partir de muestras clínicas. Sin embargo, la rapidez y especificidad de la técnica *shell-vial* en las líneas continuas favorecen su utilización rutinaria en el diagnóstico de las infecciones respiratorias virales. La obtención de una eficacia diagnóstica similar con las dos líneas celulares analizadas permitiría eliminar una del proceso rutinario de siembra disminuyendo el trabajo y el coste del proceso diagnóstico en este tipo de infecciones pediátricas.

### Bibliografía

1. Hall CB. Parainfluenza viruses. En: RD Feigin, JD Cherry, editores. Textbook of pediatric infectious diseases (3.ª ed.) Filadelfia: WB. Saunders, 1992; 1.613-1.626.
2. Chanock RM, McIntosh K. Parainfluenza viruses. En: BN Fields, DM Knipe editores. Nueva York: Raven Press, 1990; 963-988.
3. Glezen WP, Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory tract disease in children. *N Engl J Med* 1973; 288: 498-505.
4. Yun B, Kim M, Park J, Vhoi E, Lee H, Yun C. Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1.054-1.059.
5. Hollick GE, Reichrath L, Smith TF. Comparison of primary rhesus and cynomolgus monkey kidney cell cultures for viral isolation from clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 1977; 68: 276-278.
6. Madin SH, Darby NB. Technical progress report N.º 25, appendix VIII. California: Naval Biological Laboratory, 1958; 276.
7. Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF. Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 175-179.
8. Frank AL, Couch RB, Griffis CA, Baxter BD. Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of influenza and parainfluenza viruses. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 32-36.
9. Green IJ. Serial propagation of influenzae B (Lee) virus in a transmissible line of canine kidney cells. *Science* 1962; 138: 42-43.
10. Schrim J, Lujt DS, Pastoor GW, Mandema JM, Schroder FP. Rapid detection of respiratory viruses using mixtures of monoclonal antibodies on shell vial cultures. *J Med Virol* 1992; 38: 147-151.
11. Olsen MA, Shuck KM, Sambol AR, Flor SM, O'Brien J, Cabrera BJ. Isolation of seven respiratory viruses in shell vials: a practical and highly sensitive method. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 422-425.
12. Brumback BG, Wade CD. Simultaneous rapid culture for four respiratory viruses in the same cell monolayer using differential multicolored fluorescent confirmatory stain. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 798-801.