



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA  
NO SORO E NA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)**

**GISELE BARRETO LOPES MENEZES**

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2007**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



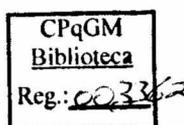
**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA NO  
SORO E NA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)**

**GISELE BARRETO LOPES MENEZES**

**Salvador – Bahia – Brasil  
2007**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA NO  
SORO E NA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)**

**GISELE BARRETO LOPES MENEZES**

**Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia, área de concentração em Patologia Experimental.

**Salvador – Bahia – Brasil  
2007**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M543d Menezes, Gisele Barreto Lopes  
Detecção e quantificação do VHC-RNA no soro e na saliva de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) [manuscrito] / Gisele Barreto Lopes Menezes. - 2007.  
000 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

1. HCV. 2. Saliva. 3. Carga Viral. 4. RNA. I.Título.

CDU 616.36-002:591.131.3

L12 781

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA NO  
SORO E NA SALIVA DE PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)**

**GISELE BARRETO LOPES MENEZES**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

**André Castro Lyra**  
Prof. Adjunto da UFBA

---

**Regina Célia Moreira**  
Pesquisador Científico IV

---

**Mitermayer Galvão dos Reis**  
Pesquisador 1 A do CNPq

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

### **Dedicatória**

A Deus por ter me dado coragem e força nos momentos difíceis;

Ao meu esposo Darlan, por todo amor, carinho e compreensão;

Aos meus pais pelo amor e apoio muito importantes para minha formação;

Aos meus irmãos e sobrinhos por todo carinho e atenção.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pela orientação, confiança e incentivo.

Aos voluntários que participaram deste estudo, tornando possível a execução deste trabalho.

Ao LACEN pela colaboração estabelecida, permitindo o contato com os voluntários.

Aos diretores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) por disponibilizar as condições para quantificação do VHC-RNA pelo PCR em tempo real. Em especial ao Dr. Marco Aurélio Krieger pelo incentivo e sugestões importantes para execução deste trabalho.

Ao Mestre César Duarte pela atenção e ensinamentos na execução da quantificação do VHC-RNA pelo PCR em tempo real.

Aos funcionários do Setor de Virologia do LACEN pelo apoio e pelo treinamento com o Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor, em especial a doutoranda Maria Alice Zarife.

À Dra. Aldina Barral, coordenadora do Curso de Pós-graduação em Patologia FAMED-UFBA/FIOCRUZ-BA, e demais professores por todo conhecimento transmitido ao longo do curso.

À Rosália Oliveira e Tauar Sampaio, secretários do curso de Pós-graduação pela dedicação e apoio aos alunos.

À Ana Maria Fiscina Sampaio, bibliotecária do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pelo auxílio na revisão das referências e formatação final da dissertação.

À doutoranda Fernanda Pereira pelo incentivo, colaboração e carinho nas etapas de execução deste trabalho, além das sugestões incorporadas nesta dissertação.

À Mestre Theomira Carmo pela amizade e ajuda durante a execução deste trabalho.

As biólogas Itatiana Rodart e Maria Betânia Silva pela amizade e apoio durante a execução deste trabalho.

À Lana Abreu e Vanja Ferreira pela realização das entrevistas e das coletas das amostras dos voluntários.

À economista Hilda Marques pelo apoio na aquisição de reagentes e kits.

Ao doutorando Hermes Pedreira pela realização dos exames orais dos voluntários.

À Mestre Ana Paula Oliveira Menezes pelo carinho e amizade constante durante a execução deste trabalho.

À estudante de Iniciação Científica Islane do Espírito Santo pelo auxílio no processamento das amostras.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Patologia Experimental pela amizade e carinho e bons momentos compartilhados.

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular pela amizade, carinho e companheirismo.

Aos meus amigos Verena Carneiro, Gustavo Medeiros, Lafayette Menezes e Naiana Bonna pela companhia constante e compreensão a mim oferecida.

Aos demais que embora não foram citados, contribuíram de alguma forma para minha formação profissional e pessoal.

# SUMÁRIO

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 HISTÓRICO	19
2.2 O VÍRUS DA HEPATITE C	19
2.3 EPIDEMIOLOGIA	21
2.4 VIAS DE TRANSMISSÃO	22
2.5 TESTES DIAGNÓSTICOS	23
2.5.1 Ensaios Sorológicos	23
2.5.2 Testes Suplementares	24
2.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	24
2.6.1 Detecção Qualitativa	24
2.6.2 Determinação da Carga Viral	25
2.7 DETECÇÃO DO VHC NA SALIVA UTILIZANDO O TESTE DE ELISA	26
2.8 DETECÇÃO DO VHC-RNA NA SALIVA	28
2.9 QUANTIFICAÇÃO DO VHC – RNA NA SALIVA	33
2.10 DETECÇÃO DO VHC-RNA NO SORÓ DE PORTADORES DE PATOLOGIAS ORAIS	34
<b>3 HIPÓTESE</b>	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
5.1 TIPO DE ESTUDO	37
5.2 AMOSTRA	37
5.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
5.4 DETECÇÃO DO VHC-RNA	37
5.5 GENOTIPAGEM	37
5.6 CARGA VIRAL	38
5.7 ESFREGAÇO DAS AMOSTRAS DE SALIVA	39
5.8 EXAME BUCAL	39
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>41</b>
6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	41

6.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS	41
6.3 CARGA VIRAL NO SORO E NA SALIVA ATRAVÉS DA PCR EM TEMPO REAL	41
6.4 CARGA VIRAL NO SORO E NA SALIVA ATRAVÉS DO AMPLICOR®	45
6.5 LÂMINAS COM ESFREGAÇOS DE SALIVA	48
6.6 EXAMES BUCAIS	48
6.7 GENÓTIPOS E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA	49
6.7.1 Genótipos e Quantificação do VHC-RNA no soro através do Amplicor® e da PCR em Tempo Real	49
6.7.2 Genótipos e Quantificação do VHC-RNA no saliva através do Amplicor® e da PCR em Tempo Real	50
<b>7 DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>10 PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>
<b>Anexo I</b>	<b>66</b>
<b>Anexo II</b>	<b>71</b>
<b>Anexo III</b>	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

- |           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1: | Correlação entre os níveis de carga viral através da PCR em Tempo Real no soro e na saliva.   | 44 |
| Figura 2: | Concordância entre os níveis de VHC-RNA no soro e na saliva com resultados da PCR em Tempo Real da através metodologia de Bland-Altman.     | 44 |
| Figura 3: | Correlação entre os níveis de carga viral através do Amplicor <sup>®</sup> no soro e na saliva de pacientes infectados pelo VHC.            | 47 |
| Figura 4: | Concordância entre os níveis de VHC-RNA no soro e na saliva com resultados do Amplicor <sup>®</sup> através da metodologia de Bland-Altman. | 47 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Resultados das reações de PCR em Tempo Real expressos em Ct e em n° de cópias/reacção em amostras pareadas de soro e saliva.	42
Tabela 2:	Resultados das reações de PCR em Tempo Real expressos em n° de cópias/mL e n° de cópias log <sub>10</sub> /mL em amostras pareadas de soro e saliva.	43
Tabela 3:	Resultados quantitativos em log <sub>10</sub> /mL utilizando o teste Amplicor <sup>®</sup> HCV Monitor no soro e na saliva.	46
Tabela 4:	Resultado da avaliação bucal e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor <sup>®</sup> HCV Monitor expressos em log <sub>10</sub> .	49
Tabela 5:	Resultado de genótipos e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor <sup>®</sup> HCV Monitor nas amostras de soro.	50
Tabela 6:	Resultado de genótipos e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor <sup>®</sup> HCV Monitor nas amostras de saliva.	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

anti-VHC	anticorpo contra o vírus da hepatite C
b-DNA	DNA ramificado (do inglês, <i>branched- DNA</i> )
CPOD/DMFT	dentes cariados, perdidos e obturados (do inglês, <i>decayed, missing, filled and teeth</i> )
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Ct	ciclo limiar (do inglês, <i>cycle threshold</i> )
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
ELISA	ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FAM	6-carboxifluoresceína
Fiocruz	Fundação e Instituto Oswaldo Cruz
FRET	transferência de energia por ressonância de fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> )
HNANB	Hepatite não-A não-B
HIV	vírus da imunodeficiência humana
LACEN	Laboratório Central da Bahia
NIH	do inglês, <i>National Institute of Health</i>
NC	não codificantes
NS	não estrutural(is)
ORF	fase aberta de leitura (do inglês, <i>open reading frame</i> )
pb	pares de base
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico (do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )

PCR	reação da polimerase em cadeia (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
RIBA	ensaio de immunoblot recombinante (do inglês, <i>recombinant immunoblot assay</i> )
RFLP	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcrição reversa (do inglês, <i>reverse transcription</i> )
Taq DNA	DNA polimerase do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
TMA	amplificação mediada por transcrição (do inglês, <i>transcription mediated amplification</i> )
UDI	usuários de drogas intravenosas
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UI/mL	unidades internacionais/ mililitro
VHB	vírus da hepatite B
VHC/HCV	vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i> )
VHC-RNA	ácido ribonucléico do vírus da hepatite C

## RESUMO

A infecção causada pelo vírus da hepatite C (VHC) é um importante problema de saúde pública, sendo estimado que 170 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo. O VHC pode ser encontrado no sangue e em outros fluidos corpóreos como na saliva, sêmen e suco gástrico o que pode explicar o fato de alguns pacientes possuírem rota de transmissão desconhecida. A utilização de testes qualitativos e quantitativos é imprescindível para diagnosticar a infecção pelo VHC e monitorar a terapia. O presente estudo tem o objetivo de verificar a existência de correlação entre os níveis de carga viral do VHC-RNA na saliva e no soro de pacientes infectados pelo VHC. O nível médio do VHC-RNA encontrado na saliva foi de  $2,8 \times 10^4$  cópias/mL ( $3,44 \log_{10}$ ) e  $7,44 \times 10^3$  cópias/mL ( $3,60 \log_{10}$ ), enquanto no soro foi de  $5,9 \times 10^6$  cópias/mL ( $5,87 \log_{10}$ ) e  $1,51 \times 10^5$  cópias/mL ( $5,17 \log_{10}$ ) através do PCR em tempo real e Amplicor<sup>®</sup>, respectivamente. Foi observado que o nível médio do VHC-RNA presente na saliva foi  $1,70 \log_{10}$  e  $1,60 \log_{10}$  vezes inferior ao encontrado no soro, através do PCR em tempo real e Amplicor<sup>®</sup>, respectivamente. Foi observada diferença estatisticamente significante entre os níveis VHC-RNA no soro e na saliva. No entanto, não foi observada correlação significante entre os níveis VHC-RNA presentes no soro e na saliva. Foi possível quantificar o VHC-RNA nas amostras de soro e saliva dos pacientes. Entretanto não houve correlação entre os níveis de VHC-RNA encontrados na saliva e no soro dos pacientes, sugerindo a necessidade de estudos epidemiológicos para melhor entendimento da importância da saliva como via de transmissão para o VHC.

Palavras chaves: HCV, saliva, carga viral, RNA.

## ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection represents a major public health problem, estimated that 170 millions of people are infected in the world. HCV can be found in blood and other body fluids, such saliva, semen and gastric juice, what might explain the fact that some patients have unknown route of transmission. The use of qualitative and quantitative tests is essential to diagnose the HCV infection and to monitor the therapy. The aim of this study was correlation the levels of viral load of the HCV-RNA in saliva and serum of infected patients. The average level of HCV-RNA found in saliva was  $2,8 \times 10^4$  copies/ml ( $3,44 \log_{10}$ ) and  $7,44 \times 10^3$  copies/ml ( $3,60 \log_{10}$ ), while in serum was  $5,9 \times 10^6$  copies/ml ( $5,87 \log_{10}$ ) and  $1,51 \times 10^5$  copies/ml ( $5,17 \log_{10}$ ) with PCR in real time and Amplicor<sup>®</sup> respectively. The average level of HCV-RNA found in saliva was of  $1,70 \log_{10}$   $1,60 \log_{10}$  time lower that in the serum with PCR in real time and Amplicor<sup>®</sup> respectively. There was significance difference between the levels of HCV-RNA in serum and saliva. However, there was not significant correlation between the levels of HCV-RNA in serum and saliva. It was possible to quantify the HCV-RNA in samples of serum and saliva of the patients, however there was no correlation between the levels of HCV-RNA found in saliva and serum of the patients what suggests epidemiological studies designed to understand the significance of the oral of transmission of HCV are warranted.

Key words: HCV, saliva, viral load, RNA

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção causada pelo vírus da hepatite C (VHC) é um importante problema de saúde pública, sendo estimado que 170 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo. Cerca de 80% dos indivíduos infectados desenvolvem hepatite crônica, sendo que em torno de 20% podem evoluir para um quadro de cirrose com uma progressão para carcinoma hepatocelular em aproximadamente 3% dos casos. Aproximadamente 430.000 casos de carcinoma hepatocelular no mundo são causados por infecções por vírus hepatotrópicos, com 115.000 associados ao VHC.

A infecção pelo VHC é mais prevalente em indivíduos transfundidos, transplantados, pacientes hemodialisados, usuários de drogas intravenosas (UDI) e indivíduos tatuados. As vias de transmissão sexual e vertical são consideradas raras.

O VHC pode ser encontrado no sangue e em outros fluidos corpóreos como saliva, leite materno, secreções vaginais e sêmen, o que pode explicar o fato de alguns pacientes possuírem rota de transmissão desconhecida. Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a presença do RNA do VHC (VHC-RNA) na saliva de pacientes infectados, com taxas variando de 0% a 100%. Alguns autores sugerem a importância da saliva contaminada na propagação intrafamiliar. Apesar de vários estudos demonstrarem a detecção do VHC-RNA na saliva, a probabilidade de transmissão do VHC através da saliva é desconhecida.

A maioria dos estudos indica a presença do VHC-RNA na saliva, mas não esclarece o mecanismo de entrada do vírus na saliva, a significância clínica da presença do VHC-RNA neste fluido biológico, nem a possibilidade de transmissão através da exposição à saliva. A reduzida prevalência do VHC observada através dos estudos de base populacional demonstra que a transmissão do VHC através da saliva é improvável. Uma das prováveis explicações seriam os baixos níveis de carga viral do VHC-RNA encontrados na saliva, prováveis modificações na partícula viral presente na saliva ou possível presença de inibidores neste fluido; estes aspectos devem ser melhor investigados.

O presente estudo tem o objetivo de verificar se existe diferença na carga viral do VHC-RNA presente no soro e na saliva de indivíduos infectados pelo VHC. Foi realizada uma avaliação da correlação entre a carga viral no soro e na saliva de

pacientes infectados pelo VHC, utilizando-se duas metodologias distintas, Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor (Roche Diagnostics, Indianópolis, IN) e PCR em Tempo Real ((Applied Biosystem, Foster City, CA).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO

Nos anos 70, alguns pesquisadores observaram a existência de um agente infeccioso que acarretava inflamação hepática para o qual não existiam marcadores sorológicos conhecidos na época. Esta doença foi então denominada hepatite não-A não-B (HNANB) (FEINSTONE, *et al.*, 1975; PRINCE&JASS, 1974).

Estudos demonstravam que o agente que causava a HNANB se tratava de um vírus pequeno, envelopado e transmissível em chimpanzés e possuía relação com transfusão sanguínea (ALTER, *et al.*, 1989; CHOO, *et al.*, 1989; KUO, *et al.*, 1989).

Em 1989, Choo *et al* caracterizaram este vírus através de técnicas de biologia molecular. Eles observaram que se tratava de um vírus pequeno que continha uma molécula de RNA de polaridade positiva e seu envelope era composto basicamente por lipídeos. O vírus descrito possuía cerca de 10.000 nucleotídeos e provavelmente pertencia à família *flaviviridae*. Este passou a ser conhecido como vírus da hepatite C.

A partir do conhecimento do genoma do VHC foi possível o desenvolvimento de testes sorológicos capazes de detectar anticorpos contra o vírus (KUO, *et al.*, 1989). A utilização destes testes demonstrou que o VHC era o principal agente causal de hepatite pós-transfusional (FARCI, 2002; TREMOLADA, *et al.*, 1991) e sua posterior implantação em bancos de sangue reduziu os casos atribuídos a HNANB (ALTER, *et al.*, 1989; DONAHUE, *et al.*, 1992). Ao longo do tempo, ocorreu o desenvolvimento testes mais específicos e sensíveis diminuindo o risco de transmissão do VHC através de transfusões sanguíneas (FARCI, 2002).

### 2.2 O VÍRUS DA HEPATITE C

O VHC pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*. É um vírus pequeno e envelopado, que possui tropismo para o fígado podendo acarretar inflamação, dano celular e reações fibróticas no tecido hepático (PENIN, *et al.*, 2004). O genoma do VHC é composto por uma molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva e possui cerca de 9600 nucleotídeos. O VHC contém duas regiões não codificantes (5'NC e 3'NC) que flanqueiam uma fase aberta de leitura (ORF- "open reading frame"). A ORF codifica uma única poliproteína precursora que varia de 3008 a 3037

aminoácidos dependendo do genótipo viral (CLARKE, 1997; MORADPOUR&BLUM, 2004; PENIN, *et al.*, 2004).

A região 5' NC é conservada, sendo utilizada comumente nos testes diagnósticos. Esta região contém um sítio de entrada para o ribossomo (IRES) que se liga à subunidade 40 S e inicia a tradução da poliproteína. A 3'NC é composta de uma região variável e uma região conservada de 98 nucleotídeos que participa da replicação do genoma viral (MORADPOUR&BLUM, 2004; PENIN, *et al.*, 2004).

A poliproteína precursora sofre ação de proteases virais e do hospedeiro originando proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais incluem as proteínas do nucleocapsídeo e as glicoproteínas do envelope (E1 e E2). Entre as proteínas estruturais e não estruturais encontra-se o polipeptídeo p7 que se acredita estar relacionado com a formação de um canal iônico. A glicoproteína E2 possui duas regiões de hipervariabilidade 1 e 2 (HVR1 e HVR2) que devido à ação de anticorpos sofrem diversas mutações. A glicoproteína E2 contém também um sítio de ligação para uma tetraspanina (CD81), um receptor para entrada do vírus presente nos hepatócitos e linfócitos (LAUER&WALKER, 2001).

As proteínas não - estruturais incluem as proteases (NS2, NS3), um co-fator (NS4A), uma helicase (NS3), uma fosfoproteína (NS5A), uma RNA polimerase (NS5B) e uma proteína de função desconhecida (NS4B) (STUMPF&PYBUS, 2002).

O VHC possui uma importante variabilidade genética, apresentando uma taxa de mutação de 1,5 a 2,0 x 10<sup>-3</sup> substituições de bases nucleotídicas/local no genoma/ano (BUKH , *et al.*, 1995). É classificado em seis genótipos principais numerados em algarismos arábicos (1 a 6) e mais de 50 subtipos que são designados utilizando estes números seguidos por letras ( 1a, 1b, 2a ....), além de quasispécies e isolados (CHAN , *et al.*, 1992; FARCI&PURCELL, 2000). O conhecimento do genótipo viral é indispensável para definir a duração e o tipo do tratamento antiviral, além de sua importância para estudos epidemiológicos. O portador do genótipo 1 é normalmente tratado por um ano, enquanto os portadores dos genótipos 2 e 3 por 6 meses (LAUER&WALKER, 2001).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

A infecção causada pelo VHC é um importante problema de saúde pública, estimando-se que aproximadamente 170 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo (LAUER&WALKER, 2001)..

O VHC possui uma ampla distribuição mundial, porém sua prevalência e a distribuição genotípica varia de acordo com a região estudada. A menor prevalência é encontrada na Escandinávia e Reino Unido (0,01-0,1%); no Brasil, Leste Europeu e no Mediterrâneo são observadas taxas intermediárias (1-5%) de prevalência, enquanto no Egito encontramos a taxa mais alta de prevalência (17-26%) (WASLEY&ALTER, 2000). Com relação a distribuição dos genótipos observamos o predomínio dos genótipos 1, 2 e 3 na Europa, Estados Unidos e Japão (BUKH, *et al.*, 1995), o genótipo 4 na África do Norte e Central e no Oriente Médio (MCOMISH, *et al.*, 1994), o genótipo 5 no Sul da África (SMUTS&KANNEMEYER, 1995) e o genótipo 6 no Sudoeste Asiático (MCOMISH, *et al.*, 1994).

No Brasil, a prevalência média estimada é de 1,5%, com cerca de 2,4 milhões de infectados (ROSEN, *et al.*, 2002). Em Salvador, estima-se que aproximadamente 1,5% da população esteja infectada (ZARIFE, *et al.*, 2006b). O genótipo 1 é o mais prevalente em todas as regiões do Brasil, seguido dos genótipos 3 e 2 (CAMPIOTTO, *et al.*, 2005). Os genótipos 4 e 5 são raros (CAMPIOTTO, *et al.*, 2005). Recentemente foi diagnosticado pela primeira vez um caso do genótipo 4 na Bahia (ZARIFE, *et al.*, 2006a) e três casos do genótipo 5 em um estudo de filogenia que utilizou amostras de vários estados do Brasil (LEVI, *et al.*, 2002). Em Salvador, um estudo com pacientes ambulatoriais demonstrou que 62,7% era do tipo 1, 3,6% do tipo 2, 21,7% do tipo 3, e 12% de genótipo mistos (SILVA, *et al.*, 2000). Entretanto, o estudo de base populacional, também realizado em Salvador, demonstrou discreto predomínio do genótipo 3 com 53,3 %, seguido do genótipo 1 com 40% e genótipo 2 com 6,7% (ZARIFE, *et al.*, 2006b). Estes dados demonstram a variação na prevalência dos genótipos de acordo com a população estudada.

A história natural da infecção pelo VHC está relacionada com características do vírus (carga viral, genótipo, quasispécies), fatores do hospedeiro (idade, sexo, raça, resposta imune e patrimônio genético) e fatores ambientais (abuso de bebida alcoólicas, coinfeções), importantes para definir a progressão da doença (AMARAPURKAR, 2000).

A infecção pelo VHC persiste em cerca de 80% dos indivíduos infectados, com o desenvolvimento da hepatite crônica e evolução para cirrose em torno de 20% dos indivíduos infectados, podendo progredir para o carcinoma hepatocelular em aproximadamente 3 % desses indivíduos (AMARAPURKAR, 2000).

#### 2.4 VIAS DE TRANSMISSÃO

O vírus da hepatite C é transmitido preferencialmente por via parenteral. Transfusões sanguíneas realizadas antes de 1993 constituem importante fator de risco para aquisição da infecção, período anterior à implantação de testes diagnósticos em bancos de sangue. Outras formas de transmissão parenteral são importantes como o uso de drogas injetáveis e inaladas, hemodiálise, acupuntura e tatuagem. Há possibilidade de transmissão sexual particularmente nos indivíduos com múltiplos parceiros e transmissão materno-fetal, embora em menor proporção (THALER , *et al.*, 1991). Alguns portadores do vírus não apresentam rota de transmissão identificada e a possível explicação pode estar na presença do VHC em fluidos biológicos como saliva, sêmen ou secreção cervicovaginal (ACKERMAN , *et al.*, 2000).

Existem dois relatos na literatura da possível transmissão do VHC através de mordida humana. Dusheiko *et al.* 1990, analisaram um caso em que o paciente apresentou sintomas de hepatite e sorologia positiva para anti - VHC, sem relatar nenhum fator de risco para aquisição do VHC (história de transfusão sanguínea ou uso de drogas). O paciente apenas relatou o fato de ter sido mordido durante uma briga. O autor conclui se tratar de transmissão via mordida humana através de saliva contaminada. Figueiredo *et al.* 1994, relataram o caso de um paciente que apresentou soroconversão para o VHC, após ser mordido pelo seu filho VHC e HIV positivo.

A possibilidade de transmissão da hepatite não - A não - B foi demonstrada experimentalmente desde 1987 por Abe e colaboradores. Abe & Inchauspe 1991, analisaram a transmissão do VHC através da saliva em chimpanzés com hepatite C crônica. O VHC – RNA foi isolado da saliva de dois chimpanzés e inoculado em um outro chimpanzé. O VHC – RNA foi detectado no soro do chimpanzé inoculado, sugerindo a infectividade da saliva de pacientes com hepatite C.

## 2.5 TESTES DIAGNÓSTICOS

A realização do diagnóstico laboratorial do VHC é possível com a utilização de ensaios sorológicos para detecção de anticorpos específicos e testes moleculares para a detecção de partículas virais (LAUER&WALKER, 2001; VAN DER POEL , *et al.*, 1994).

### 2.5.1 Ensaios Sorológicos

Os anticorpos contra o VHC são detectados através de ensaios imunoenzimáticos (EIA). O primeiro teste sorológico foi desenvolvido em 1989. Este teste é direcionado ao epitopo da proteína C100-3 da região não estrutural NS4 do vírus. Este ensaio é conhecido como ELISA de 1ª geração.

A implantação do ELISA de 1ª geração em bancos de sangue permitiu uma redução significativa da incidência de hepatite pós-transfusional não-A não-B (ALTER, *et al.*, 1989; DONAHUE, *et al.*, 1992), porém este teste apresentou algumas limitações. O teste era pouco sensível e específico e observava-se resultados falso-positivos em aproximadamente 50 a 70% dos casos em populações de baixo risco, como doadores de sangue e em pacientes portadores de hiperglobulinemia (ALTER, 1991). Mostrou-se também ineficaz na detecção de anticorpos contra o VHC em indivíduos com dezesseis semanas de exposição ao vírus (SCHIFF , *et al.*, 1999).

A implantação de testes mais específicos e sensíveis foi necessária. Com a incorporação da proteína da região de nucleocapsídeo (C22-3), da região NS3 (C33c) e da proteína C100-3 foi desenvolvido o teste de ELISA de 2ª geração. Observou-se o aumento da especificidade e sensibilidade, porém o número de falso- positivos ainda era considerado alto em populações de baixo risco e testes confirmatórios faziam-se necessários (URDEA , *et al.*, 1997).

O teste de 3ª geração está disponível desde 1993, e inclui proteínas recombinantes capazes de detectar anticorpos contra regiões do nucleocapsídeo, NS3, NS4 e NS5. A sensibilidade do teste é de 97% e a especificidade de 100% (COLIN , *et al.*, 2001). O ELISA de 3ª geração é capaz detectar anticorpos após 4 a 10 semanas de exposição ao vírus, mas podem ocorrer resultados falso-negativos em pacientes imunossuprimidos (POYNARD , *et al.*, 2003). Embora a especificidade e sensibilidade tenham aumentado sensivelmente ainda persiste a possibilidade de resultados falso-positivos em populações de baixo risco, sendo necessária a utilização de testes confirmatórios.

### 2.5.2 Testes Suplementares

O ensaio “immunoblotting” recombinante (RIBA – “recombinant immunoblot assay”) é utilizado para auxiliar no diagnóstico da infecção pelo VHC em indivíduos com ELISA positivo. É uma metodologia mais específica que o ELISA, reduzindo o número de resultados de falso-positivos. Porém, indivíduos com resultados prévios de ELISA positivo podem resultar em RIBA negativo devido a uma reação cruzada de anticorpos não-específicos. O RIBA pode apresentar resultados positivos em indivíduos que resolveram a infecção, possuem anticorpos anti-VHC, mas não apresentam a infecção pelo VHC (FERREIRA-GONZALEZ&SHIFFMAN, 2004).

Assim como o ELISA, três gerações de RIBA foram desenvolvidas, com a implantação de testes cada vez mais específicos (URDEA, *et al.*, 1997). Atualmente o RIBA é utilizado raramente devido ao desenvolvimento de testes moleculares capazes de detectar a presença do VHC - RNA para confirmar a infecção (LAUER&WALKER, 2001).

## 2.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A detecção VHC - RNA é imprescindível para confirmar a viremia pelo VHC em indivíduos com exposição recente ao vírus, durante a fase aguda da doença sem soroconversão, em imunossuprimidos e em pacientes com infecção crônica ou apenas com sorologia positiva (STRAUSS, 2001). Tem importância também no acompanhamento da resposta terapêutica e em portadores de hepatite criptogênica (LAUER&WALKER, 2001). Os testes de detecção do VHC-RNA podem ser divididos em qualitativos e quantitativos.

### 2.6.1 Detecção Qualitativa

Os testes qualitativos mais utilizados são a transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) e a amplificação mediada por transcrição (TMA – “transcription mediated amplification”). A metodologia de RT-PCR consiste na extração do RNA viral seguida pela transcrição reversa, utilizando uma enzima transcriptase reversa e obtendo o DNA complementar (cDNA). O cDNA é posteriormente amplificado através da reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando iniciadores (*primers*) específicos para o VHC.

Existe atualmente um teste qualitativo disponível comercialmente, baseado na metodologia de RT-PCR, o Amplicor<sup>®</sup> HCV (Roche Diagnostics, Indianópolis, IN). Este teste possui um limite inferior de detecção de 50 UI/mL.

O TMA é um teste disponível comercialmente, o Versant<sup>®</sup> (Bayer Health Care, Berkley, CA), é um teste mais sensível que o RT-PCR podendo detectar menos que 10 UI/mL (FERREIRA-GONZALEZ&SHIFFMAN, 2004).

### 2.6.2 Determinação da Carga viral

A determinação da carga viral do VHC-RNA é importante para definir a interrupção ou continuidade ao tratamento em indivíduos infectados pelo genótipo 1. O *National Institute of Health* (NIH) recomenda que indivíduos infectados pelo genótipo 1, submetidos ao tratamento com antivirais após 12 semanas, que obtiverem um decréscimo de  $2 \log_{10}$  na carga viral deve continuar a terapia, enquanto os indivíduos que não obtiverem um decréscimo de  $2 \log_{10}$  na carga viral a terapia pode ser interrompida (CONSENSUS, 2002). A determinação da carga viral do VHC-RNA pode ser realizada através da PCR em Tempo Real ou através de testes comerciais como o AmpliCor<sup>®</sup> HCV Monitor (Roche Diagnostics, Indianópolis, IN) e Branched- DNA (Quantiplex HCV RNA, Chiron Diagnostic, Emeryville, USA).

A PCR em Tempo Real detecta a quantidade da molécula alvo produzida durante todo período de amplificação, o que reduz o tempo de detecção da amostra que está sendo amplificada. É também capaz de quantificar as amostras em diferentes concentrações sem a necessidade de diluições (FERREIRA-GONZALEZ&SHIFFMAN, 2004).

O desenvolvimento da metodologia de PCR em Tempo Real foi possível devido a duas importantes descobertas: a atividade polimerase e exonuclease 5'-3' da *thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase e o desenvolvimento de sondas ligadas covalentemente com um fluoróforo (OVERBERGH, *et al.*, 2003).

O primeiro ensaio de PCR em Tempo Real desenvolvido foi o TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystem, Foster City, CA). Neste ensaio são utilizadas sondas que se ligam na seqüência alvo entre os iniciadores interno e externo. A sonda está ligada na extremidade 5' a um fluoróforo e na extremidade 3' a um *quencher*. A emissão de fluorescência emitida pelo fluoróforo é absorvida pelo *quencher*. Este fenômeno é conhecido como transferência de energia fluorescente (FRET – “Fluorescence Ressonance Energy Transfer). A sonda é degradada pela atividade exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase na fase de extensão da molécula alvo, o que resulta na separação do fluoróforo e do *quencher*, com conseqüente emissão de fluorescência. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade de produto formado a cada ciclo

da PCR, por isso pode ser aplicado na quantificação de moléculas amplificadas (OVERBERGH, *et al.*, 2003).

A fluorescência gerada aumenta à medida que os fluoróforos se tornam livres do fenômeno FRET. Quando esta alcança um limiar acima da fluorescência basal na fase exponencial da reação, um programa do sistema correlaciona o ciclo em que isto ocorreu (ct – “cycle threshold”) com as informações decorrentes da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras (MACKAY, *et al.*, 2002).

Outra maneira de quantificar amostras através da metodologia de PCR em Tempo Real, é utilizando moléculas fluorogênicas que se ligam às moléculas de DNA. O Syber<sup>®</sup> Green, o brometo de etídio e o YO-PRO-1 são exemplos destas moléculas, que emitem fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita.

Em uma PCR, ocorre comumente a formação de dímeros de *primers*. Como esses fluoróforos não são específicos, podem intercalar a dímeros de *primers* e produtos amplificados não específicos e interferir na interpretação dos resultados (MACKAY, *et al.*, 2002). Este problema pode ser atenuado com a utilização de *software* capaz de medir a dissociação da fluorescência (MACKAY, *et al.*, 2002), porém estas limitações fazem o ensaio TaqMan<sup>®</sup> mais específico.

O Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor baseia-se na comparação da amostra de VHC – RNA a ser estudada com um padrão interno que é adicionado à reação de PCR. O limite de detecção do teste varia de  $6,0 \times 10^2$  UI/mL a  $8,5 \times 10^5$  UI/mL. O método de bDNA, por outro lado amplifica o sinal emitido da detecção de sondas que se ligam ao DNA ou RNA alvo e o limite de detecção varia de  $6,5 \times 10^2$  UI/mL a  $8 \times 10^6$  UI/mL (FERREIRA-GONZALEZ&SHIFFMAN, 2004).

## 2.7 DETECÇÃO DO VHC NA SALIVA UTILIZANDO O TESTE DE ELISA

A saliva é um fluido corpóreo de fácil obtenção. Sua coleta é considerada não invasiva e de baixo custo quando comparada com a coleta de sangue. A utilização da saliva como método de detecção de doenças infecciosas é de grande interesse, principalmente em grupos de pacientes onde existem dificuldades de coleta de sangue, como em crianças, usuários de drogas, hemofílicos e pacientes obesos. Por este motivo, diversos estudos são realizados para comprovar a possibilidade da detecção do VHC na saliva.

A presença de anticorpos do VHC na saliva em pacientes com sorologia positiva para o VHC foi constatada em vários estudos (BELLO , *et al.*, 1998; CAMERON , *et al.*, 1999; ELSANA , *et al.*, 1998; SHERMAN , *et al.*, 1994). Alguns autores testaram a sensibilidade e especificidade de testes de ELISA utilizando amostras de saliva. Foram observados diferentes valores de sensibilidade e especificidade provavelmente devido aos diferentes métodos de coleta e de detecção de anticorpos contra o VHC empregados nestes estudos, além destes estudos terem sido realizados em populações diferentes (COCK DE , *et al.*, 2005) .

Sherman *et al.*, 1994, e Bello *et al.*, 1998, utilizando o teste de ELISA da Abbott AxSYM HCV 3.0<sup>®</sup> (Abbott Diagnostic, Chicago, IL), obtiveram sensibilidade de 94,4% e de 98,2%, respectivamente e especificidade de 99,1%, em ambos os trabalhos, sugerindo o uso da saliva em estudos epidemiológicos.

McIntyre *et al.*, 1996, analisaram 18 pacientes com sorologia positiva para o VHC e 49 pacientes negativos e obtiveram sensibilidade de 72% e especificidade de 98% com o Kit Ortho HCV 3.0<sup>®</sup> (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ) e ao utilizar o kit Monalisa<sup>®</sup> (Sanofi Pauster, Marne-la-Coquette, França) obtiveram sensibilidade e especificidade de 100%. Neste trabalho foi utilizado o sistema de coleta Salivettes collection<sup>®</sup> .

Em um estudo realizado em 2001, foi analisado dois diferentes Kits de ELISA, o Ortho HCV 3.0<sup>®</sup> (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ) e o Monalisa<sup>®</sup> (Sanofi Pauster, Marne-la-Coquette, França). Foram incluídos no estudo 152 indivíduos UDI e infectados pelo HIV e destes 102 pacientes (67%) eram anti-VHC positivos no soro. Foi encontrada uma positividade de 79% a 88% de anti-VHC na saliva. A detecção do VHC-RNA na saliva ocorreu em 76 dos 102 (74,5%) pacientes anti-VHC positivos no soro. Os autores sugeriram o uso da saliva apenas em estudos epidemiológicos (VAN DOORNUM , *et al.*, 2001).

Allwright *et al.*, 2000 e Judd *et al.*, 2003, utilizaram o sistema de coleta Orasure<sup>®</sup> (Epitope Incorporated, Beaverton, Oregon, US) e o kit Ortho HCV 3.0<sup>®</sup> (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ), obtendo sensibilidade de 84% e 87% respectivamente, e 100% de especificidade. Utilizando também o kit Ortho HCV 3.0<sup>®</sup> (Ortho Diagnostic, Raritan, NJ), e sistema de coleta Oracol<sup>®</sup> (Malvern Medical Development, UK) De Cock *et al.*, 2004, encontraram sensibilidade de 89% e especificidade de 100%.

Alguns estudos obtiveram elevado valor de especificidade, provavelmente por utilizar amostras de pacientes que pertenciam a grupos de risco como prisioneiros, UDI

e portadores do HIV, que geralmente possuem títulos altos de anticorpos (ALLWRIGHT, *et al.*, 2000; BELLO, *et al.*, 1998; JUDD, *et al.*, 2003; SHERMAN, *et al.*, 1994).

Cock De *et al.*, 2005 com o objetivo de analisar a correlação entre a presença do VHC - RNA no soro e a detecção de anticorpos anti-VHC na saliva, observaram que a detecção do anticorpo na saliva possui sensibilidade levemente aumentada quando os pacientes apresentaram VHC-RNA detectável no soro.

Um estudo recente realizado no Brasil utilizou o sistema de coleta Orasure<sup>®</sup> (Epitope Incorporated, Beaverton, Oregon, US) e o kit de ELISA UBI HCV EIA 4.0<sup>®</sup> (United Biomeical, US) e obteve sensibilidade de 75% e especificidade de 100%. A população estudada foi de indivíduos com suspeita clínica de hepatite viral que eram encaminhadas ao Centro de Referência do Instituto Oswaldo Cruz. Os autores também concluíram que os kits comerciais de ELISA podem ser utilizados para estudos epidemiológicos (AMADO, *et al.*, 2006).

## 2.8 DETECÇÃO DO VHC-RNA NA SALIVA

O primeiro registro de detecção do RNA do vírus da hepatite C na saliva foi descrito por Takamatsu *et al.*, 1990. O VHC-RNA foi extraído da saliva de cinco pacientes com anti-VHC positivos, portadores de hepatite C crônica. Foi demonstrado 100% de positividade. Os autores sugeriram que a presença do VHC-RNA na saliva se devia a presença de células mononucleares infectadas na saliva total.

A preocupação com a possível transmissão do VHC através de fluidos corpóreos impulsionou vários pesquisadores a investigar a presença do VHC-RNA em vários fluidos corpóreos, mas os achados na literatura mostram-se contraditórios. Uma possível explicação deve-se às diferenças nas metodologias de coleta empregadas, na estocagem do material, ou na técnica de extração e detecção do RNA viral. Hsu *et al.*, 1991 estudaram 19 pacientes com VHC – RNA positivo no soro e, ao investigar amostras de saliva, sêmen, urina e secreções vaginais não detectaram o VHC – RNA. Em 1992, Fried *et al.*, também não encontraram positividade nas amostras de saliva e sêmen de 14 pacientes com VHC – RNA presentes no soro. Resultados contraditórios foram observados por Liou *et al.*, 1992, que avaliaram a presença do VHC-RNA em soro, saliva, urina, líquido seminal e ascite através da técnica de *Nested* PCR. Os autores estudaram 52 pacientes com doença hepática crônica e anti-VHC positivos. Do total, 81% (42/52) apresentaram VHC - RNA detectáveis no soro. Entre estes pacientes

infectados, 39 aceitaram doar os fluidos e foi observada a seguinte prevalência: saliva 48% (15/31), urina 7% (2/29), líquido seminal 24% (4/17) e 100% (7/7) ascite. O estudo sugere que a presença do VHC – RNA nesses fluidos corpóreos represente uma possível via de transmissão. Existem ainda estudos que evidenciam taxas de 100% de detecção do VHC – RNA na saliva (LINS , *et al.*, 2005; TAKAMATSU , *et al.*, 1990; WANG , *et al.*, 1991).

Komiyama *et al.*, 1995, verificaram a presença do VHC – RNA no suco gástrico e na saliva de 32 pacientes com HNANB, cirrose ou carcinoma hepatocelular e sorologia positiva para anticorpos anti-VHC. Foi observada positividade de 66% na saliva e de 65% no suco gástrico, indicando a importância desses fluidos como potencial fonte de transmissão, principalmente em clínicas e hospitais. Os mesmos autores, em 1991, estudaram amostras de saliva de 6 pacientes VHC-RNA positivo no soro sem tratamento com antivirais e 7 pacientes sob tratamento com antivirais. Foi encontrada positividade em 2 amostras de saliva do primeiro grupo, enquanto as amostras de saliva dos pacientes que estavam sob tratamento foram todas negativas, sugerindo que o uso de antivirais pode diminuir a concentração do vírus não apenas no soro, mas também na saliva.

Couzigou *et al.*, 1993, obtiveram positividade de 62% de VHC – RNA na saliva ao estudar 37 pacientes infectados pelo VHC, concluindo que a presença VHC – RNA na saliva é uma possível fonte de infecção do VHC, embora não esteja determinado o seu papel na transmissão. Sugimura *et al.*, 1995, estudaram uma população rural no Japão. Foram incluídos no estudo 76 portadores crônicos do VHC e obteve-se 36% (27/76) de indivíduos com o VHC-RNA detectável na saliva. Numata *et al.*, 1993, examinaram amostras de saliva e de urina obtidas de 23 pacientes com VHC – RNA positivos no soro. Foi encontrada positividade em 34,8% (8/23) das amostras de saliva e em 56,5% (13/23) das amostras de urina.

Wang *et al.*, 1992, avaliaram a possibilidade de transmissão entre casais. Quatorze pacientes anti-VHC positivos que receberam transfusão sanguínea foram selecionados randomicamente e amostras pareadas de soro e saliva foram coletadas. Foram coletadas também amostras de 11 cônjuges. A detecção do VHC – RNA foi observada em 10 amostras de soro, enquanto apenas 7 das amostras de saliva apresentaram VHC– RNA detectáveis nos pacientes anti-VHC positivos. Os cônjuges foram anti-VHC e VHC – RNA negativo, demonstrando um baixo risco de transmissão entre casais. Fabris *et al.*, 1999, também buscaram avaliar a prevalência do VHC – RNA

entre parceiros sexuais. Foram incluídos no estudo 45 indivíduos anti-VHC positivos, 3 indivíduos que não apresentavam anticorpo anti-VHC e 27 cônjuges. O VHC – RNA foi detectado em 86,6% (39/45) das amostras de soro e em 62,9% (22/35) das amostras de saliva dos indivíduos anti-VHC positivos. O anti-VHC foi positivo em apenas 1 dos 13 parceiros sexuais dos pacientes com VHC-RNA detectável na saliva e em 1 dos 14 parceiros sexuais de pacientes com o VHC-RNA detectável apenas no soro. O autor avaliou também a prevalência do VHC – RNA em diferentes frações da saliva (saliva total, sobrenadante e fração celular). O VHC – RNA foi detectável em maior proporção na fração celular, embora este fato não tenha demonstrado correlação com o risco aumentado de transmissão do VHC entre parceiros sexuais.

Recomenda-se como forma de prevenção para aquisição do VHC não compartilhar utensílios de uso pessoal como tesoura, alicate, barbeador e escova de dentes. O risco de uma possível contaminação com escova de dentes foi investigada em 30 pacientes com infecção crônica pelo VHC (LOCK, *et al.*, 2006). Com o objetivo de testar a presença do VHC – RNA foram coletadas 2 mL de saliva antes e depois do ato de escovar os dentes e a água do enxágüe das escovas de dentes. Observou-se positividade de 30% e 36,7% na saliva antes e depois da escovação, respectivamente. O VHC – RNA foi detectável na água do enxágüe das escovas em 40% dos casos. Os autores concluíram que existe contaminação na escova de pacientes portadores do VHC e sugerem evitar o compartilhamento de objetos de uso pessoal entre pacientes e familiares (LOCK, *et al.*, 2006). Em 1994, Puchhammer – Stöckl *et al.*, estudaram amostras de soro de 46 crianças com hepatite C crônica pós-transfusional e encontraram uma prevalência de 73% do VHC – RNA. Para investigar a prevalência do RNA viral na saliva, 35 crianças realizaram bochechos com soro fisiológico. Através de *Nested* PCR, os bochechos foram analisados quanto à presença do VHC – RNA, sendo este detectável em 20% das amostras.

Young *et al.*, 1993, avaliaram a detecção do VHC–RNA em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), na saliva e no soro de pacientes anti-VHC positivos. O VHC – RNA foi detectável em 24% (12/50) das PBMCs, sendo que 5 amostras eram VHC - RNA negativas no soro e 7 amostras eram VHC-RNA positivas. Não foi possível correlacionar a presença do VHC-RNA nas PBMCs e no soro neste trabalho. O VHC-RNA foi detectável na saliva de 25 pacientes (50%) e todos apresentaram VHC-RNA detectável no soro. Os autores sugerem que as PBMCs possam ser um alvo extra-hepático da infecção crônica pelo VHC.

Para avaliar a possibilidade do VHC ser transmitido através da saliva, a presença do VHC foi investigada no fluido crevicular e na saliva de 50 pacientes com viremia detectável no soro (MATICIC , *et al.*, 2001). Foi encontrada positividade em 59% (29/49) das amostras de fluido crevicular e em 35% (17/48) das amostras de saliva. Os autores sugerem que a saliva e o fluido crevicular são importantes rotas de transmissão do VHC e que o vírus desempenhe papel fundamental na patogênese da doença periodontal (MATICIC, *et al.*, 2001).

A recorrência da infecção pelo vírus da hepatite C após transplante hepático pode estar associada a níveis elevados de VHC – RNA no sangue periférico, o que pode promover a presença do VHC – RNA em fluidos corpóreos. Para avaliar esta correlação foram testadas amostras de fluidos corpóreos de 33 pacientes infectados pelo VHC (33 amostras de saliva, 33 amostras de urina, 9 secreções vaginais, 12 amostras de sêmen, 33 amostras de suor e 32 amostras de lágrimas). Do total de pacientes incluídos no estudo 21 receberam transplante hepático. Dos pacientes transplantados 24% (5/21) foram VHC – RNA positivos na saliva, enquanto no grupo controle (não transplantados) as amostras de saliva foram indetectáveis. O VHC-RNA não foi detectável nas amostras de urina, lágrima e sêmen (CALDWELL , *et al.*, 1996).

A possibilidade de transmissão vertical está sendo investigada em alguns estudos. Ogasawara *et al.*, 1993, avaliaram amostras de soro, saliva e leite materno de 10 pacientes VHC – RNA positivos. Do total, 5 amostras de saliva foram VHC – RNA positivas e todas as amostras de leite materno foram VHC – RNA negativas. Kage *et al.*, 1997, examinaram amostras de soro, saliva e leite materno de 11 mães portadoras do VHC e as amostras de sangue das crianças foram coletadas em diferentes períodos, de 2 a 44 meses. O VHC – RNA não foi detectado nas amostras de leite materno, porém foi detectado em 36% (4/11) das amostras de saliva das mães e nenhuma das crianças apresentaram VHC – RNA detectável no soro. Durante o período, não houve evidência de transmissão do vírus entre mães e filhos.

Chen *et al.*, 1995, investigaram a frequência do VHC–RNA em amostras de soro e saliva de pacientes submetidos à cirurgia dentária, antes e depois do procedimento cirúrgico. Foram selecionados 26 pacientes, sendo que 11 eram coinfectados com HIV. O VHC – RNA foi detectável em 88% das amostras de soro e em 17% das amostras de saliva. Apenas uma amostra de saliva foi detectável para o VHC – RNA imediatamente após o procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que o VHC – RNA está presente em menos que 25% dos anti-VHC positivos e que a saliva pode representar uma

possível via de transmissão do VHC, além do fato de que cirurgias dentárias podem aumentar o risco de transmissão do VHC.

Mariette *et al.*, 1995, estudaram 28 pacientes infectados pelo VHC, sendo 13 coinfectados com o HIV. Os autores encontraram 61% de positividade do VHC-RNA na saliva com frequência similar entre pacientes HIV positivos (53,85% - 7/13) e HIV negativos (66,6% - 10/15). Os autores também avaliaram a carga viral nas amostras de soro. O estudo concluiu que a presença do VHC - RNA na saliva tem relação com níveis elevados de VHC-RNA no soro. Eira *et al.*, 2005, estudaram a prevalência do VHC - RNA na saliva de pacientes coinfectados VHC / HIV. Foram incluídos no estudo 75 pacientes coinfectados e 75 infectados somente com o VHC. O VHC - RNA foi detectado na saliva de 65% (49/75) dos pacientes coinfectados e em 52% (39/75) dos pacientes infectados pelo VHC. A presença do VHC - RNA na saliva foi mais elevada nos indivíduos coinfectados que nos portadores de infecção apenas pelo VHC.

A presença do VHC-RNA foi investigada na saliva de 21 indivíduos portadores de hemofilia, dos quais 6 eram coinfectados com o HIV. A positividade na saliva foi observada em 47,6% (10/21) pacientes, dos quais 33,3% (2/6) eram coinfectados, demonstrando que o VHC - RNA pode estar presente na saliva de hemofílicos (ROY , *et al.*, 1996).

Existem trabalhos na literatura que evidenciam a detecção do VHC-RNA na saliva de pacientes que tiveram resultado indetectáveis no soro. Em 2001, Savoldi *et al.*, avaliaram 32 pacientes anti-VHC positivos e todos os pacientes VHC-RNA detectáveis no soro também apresentaram detecção positiva do VHC na saliva. No entanto, neste mesmo trabalho 2 pacientes com resultado positivo do VHC-RNA na saliva não apresentaram VHC-RNA detectável no soro. Harle *et al.*, 1993, encontraram 9 amostras de saliva com VHC-RNA detectáveis em pacientes com resultado indetectáveis no soro.

Alguns estudos buscam correlacionar à presença do VHC - RNA na saliva com a carga viral no soro. Lins *et al.*, 2005 investigaram a presença do VHC - RNA na saliva de 50 pacientes anti-VHC positivos e em 25 indivíduos de um grupo controle não infectado pelo VHC. O VHC - RNA foi detectável nas amostras de saliva e soro em 100% dos pacientes anti-VHC positivos e em nenhum dos pacientes do grupo controle. Não houve correlação entre a presença do VHC - RNA na saliva, carga viral no soro e a patologias na cavidade oral dos pacientes avaliados.

Alguns pesquisadores observaram correlação entre a detecção do VHC-RNA na saliva e a carga viral no soro de pacientes infectados pelo VHC. Hermida *et al.*, 2002, avaliaram a prevalência do VHC - RNA na saliva de pacientes VHC - RNA detectáveis no soro e encontraram 52,4% de positividade. Os autores observaram correlação estatisticamente significativa entre a detecção do VHC - RNA na saliva e a elevada carga viral presente no soro dos pacientes infectados. Os autores sugerem o uso da saliva para monitorar a terapia antiviral. Eira *et al.*, 2005, estudaram 75 pacientes infectados pelo VHC e encontraram um resultado estatisticamente significativo entre a detecção do VHC - RNA na saliva e carga viral no soro. O mesmo foi observado por Wang *et al.*, 2006, ao estudar 23 pacientes cronicamente infectados pelo VHC e um paciente portador de hepatite C aguda. Os autores encontraram 72% de positividade para VHC - RNA na saliva e evidenciaram a associação entre a elevada carga viral no soro e detecção do VHC - RNA na saliva em pacientes com infecção crônica e aguda pelo VHC.

## 2.9 QUANTIFICAÇÃO DO VHC - RNA NA SALIVA

Existem poucos estudos publicados correlacionando a quantificação do VHC - RNA no soro e saliva. Em 1993, Numata *et al.*, buscaram examinar a quantidade relativa do VHC - RNA em amostras de saliva, urina e soro de um paciente infectado pelo VHC. Foi utilizado um método semi-quantitativo para quantificação do VHC nesses fluidos e foram encontrados os valores de  $1 \times 10^5$  unidades de PCR/mL no soro, 50 unidades de PCR/mL na saliva e 30 unidades de PCR/mL na urina.

Alguns anos depois, Taliani *et al.*, 1997, estudaram amostras de saliva e soro de 20 pacientes com hepatite C crônica, com o objetivo de investigar a presença do VHC-RNA em células epiteliais da glândula salivar. Os autores observaram uma positividade do VHC-RNA em 100% das amostras de soro, e encontraram uma média de carga viral de  $5,42 \times 10^5$  cópias/mL. Enquanto apenas 15% (3/20) das amostras de saliva apresentaram VHC-RNA detectável e apresentaram carga viral de  $2,0 \times 10^5$  cópias/mL, o resultado foi significativamente inferior ao observado nas amostras de soro. Não foi observada evidência do VHC-RNA nas células epiteliais da glândula salivar dos pacientes estudados.

Rey *et al.*, 2001, avaliaram 59 amostras pareadas de soro e saliva de pacientes coinfectados com VHC e HIV. O VHC - RNA foi detectado a partir de *Nested* PCR e a quantificação realizada através do método de bDNA. A detecção na saliva foi positiva em 37,5% (22/59) das amostras estudadas, e o nível médio da carga viral foi estimado

em  $1,15 \times 10^6$  equivalentes genômicos/mL, enquanto no soro a prevalência foi de 76,3% (45/59) e nível médio foi de  $2,52 \times 10^7$  equivalentes genômicos/mL. O nível médio da carga viral no soro foi superior ao observado na saliva, e não foi demonstrada correlação entre a carga viral no soro e na saliva dos pacientes.

Suzuki *et al.*, 2005, buscaram examinar a presença do VHC – RNA em amostras de soro, saliva e fluido crevicular gengival a partir de testes qualitativos e quantitativos. Foram estudados 26 pacientes anti-VHC positivos, sendo que o VHC – RNA foi detectado em 77% das amostras de soro, em 31% das amostras de saliva e em 85% das amostras do fluido crevicular gengival. O nível médio da carga viral foi  $5,1 \times 10^5$  cópias/mL nas amostras de soro,  $1,9 \times 10^4$  cópias/mL nas amostras de saliva e  $3,1 \times 10^4$  cópias/mL no fluido crevicular gengival. Não foi observada correlação significativa entre os níveis de carga viral no soro, saliva e/ou fluido crevicular.

## 2.10 DETECÇÃO DO VHC-RNA NO SORO DE PORTADORES DE PATOLOGIAS ORAIS

A infecção causada pelo VHC representa uma causa comum de doença parenquimatosa crônica do fígado, porém diversas manifestações extra-hepáticas estão sendo evidenciadas (PAWLOTSKY , *et al.*, 1995). Dentre estas manifestações, estão algumas patologias orais que vem sendo associadas com a presença do VHC – RNA na saliva. A sialodênite, a síndrome de Sjögren e o líquen plano são exemplos de patologias orais relacionadas com o VHC (NAGAO , *et al.*, 1995; OHOKA , *et al.*, 2003; ROY&BAGG, 1999).

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica que afeta a pele e mucosa, sendo líquen plano oral o mais comumente encontrado. A prevalência estimada é de aproximadamente 0,02 a 1,2 % na população mundial (DUFFEY , *et al.*, 1996). A etiologia do líquen plano ainda é desconhecida, mas tem sido considerada uma doença multifatorial mediada por um mecanismo imunopatológico, envolvendo principalmente os linfócitos T (KILPI , *et al.*, 1996). A prevalência do VHC nos portadores de líquen plano varia de 4% na França a 65% no Japão (CARROZZO , *et al.*, 1996). Alguns estudos demonstram uma relação causal significativa entre o VHC e o líquen plano, enquanto outros estudos são contrários esta hipótese. Estudos recentes demonstram a relação entre a infecção pelo VHC e líquen plano oral (GROTE , *et al.*, 1998; VAN DER MEIJ&VAN DER WAAL, 2000). Em contrapartida, uma baixa prevalência da

infecção pelo VHC em pacientes com líquen plano oral foi encontrada em estudos realizados na Inglaterra (TUCKER&COULSON, 1999).

A síndrome de Sjögren é uma infiltração linfocítica das glândulas salivares, onde ocorre deposição tissular de imunocomplexos (PAWLOTSKY, *et al.*, 1995). A sialoadenite linfocítica crônica relacionada com a síndrome de Sjögren foi descrita inicialmente em 57% dos pacientes infectados pelo VHC (DICKSON, 1997). Enquanto que um estudo realizado em pacientes com Sjögren primário, demonstrou que a infecção pelo VHC ocorria em percentagem similar ao grupo controle (PAWLOTSKY, *et al.*, 1994).

### **3 HIPÓTESE**

A carga viral do VHC-RNA presente no soro possui correlação com a carga viral do VHC-RNA presente na saliva de indivíduos infectados pelo VHC.

A carga viral do VHC-RNA presente no soro não possui correlação com a carga viral do VHC-RNA presente na saliva de indivíduos infectados pelo VHC.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a existência de correlação entre a carga viral do VHC-RNA na saliva e no soro de pacientes infectados pelo VHC.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar a carga viral do VHC-RNA na saliva e no soro de pacientes infectados pelo VHC;

Correlacionar a carga viral do VHC-RNA presentes no soro e na saliva;

Realizar a genotipagem do VHC-RNA na saliva e no soro de pacientes infectados pelo VHC;

Verificar a correlação entre a carga viral do VHC-RNA no soro e na saliva e o genótipo do VHC;

Verificar a correlação entre a carga viral do VHC-RNA na saliva e presença de patologias orais.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo é do tipo descritivo de corte transversal.

### 5.2 AMOSTRA

Os voluntários foram recrutados no serviço de coleta do Laboratório Central da Bahia (LACEN), onde realizaram a coleta de sangue. Foram incluídos no estudo 29 indivíduos com VHC-RNA detectáveis no soro e na saliva. Os pacientes não haviam recebido tratamento antiviral até o momento.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 10 mL sem anticoagulante BD Vacutainer<sup>®</sup> (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA). Em seguida foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada. As amostras de saliva foram coletadas em tubos não aditivados, em um volume de aproximadamente 5 mL. As amostras de soro e saliva foram em seguida aliqüotadas e estocadas à -70° C até sua manipulação. Os voluntários realizaram bochecho com colutório e água mineral antes da coleta da saliva.

### 5.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os pacientes incluídos no estudo foram entrevistados (Anexo I) e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do IGM.

### 5.4 DETECÇÃO DO VHC-RNA

O VHC-RNA foi isolado do soro e da saliva utilizando-se 200 µL da amostra, através de uma técnica de extração baseada no kit Trizol LS<sup>®</sup> (Invitrogen). Após extração, o VHC-RNA foi transcrito imediatamente e amplificado pela técnica de *Nested* PCR utilizando-se *primers* específicos da região 5'NC, que foram previamente descritos por Chan *et al.*, 1992. Os produtos amplificados foram visualizados à luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração com brometo de etídio. O resultado detectável foi evidenciado com bandas específicas de 251 pb.

### 5.5 GENOTIPAGEM

Os produtos amplificados como descrito anteriormente foram submetidos à análise de fragmentos de restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length

Polymorphism”) pelo método descrito por Davidson *et al.*, 1995, utilizando-se as enzimas Rsa I e Hae III, e Mva I e Hinf I para digestão do produto amplificado. O padrão de restrição foi analisado após eletroforese em gel de agarose (Metaphor<sup>®</sup>, BMA) a 4% e coloração em brometo de etídio e visualização através de luz ultravioleta. Este método permite análises de todos os seis genótipos e pelo menos seis subtipos (1 a/b, 2 a/b, 3 a /b, 4, 5 e 6).

## 5.6 CARGA VIRAL

As amostras de soro e de saliva foram quantificadas através da PCR em Tempo Real utilizando a metodologia TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystem, Foster City, CA) e através do kit Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor versão 2.0 (Roche Diagnostics, Indianópolis, IN).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando iniciadores e sondas desenhadas por Duarte *et al.*, 2006. Os experimentos foram realizados no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

A curva padrão externa foi obtida a partir da inserção da região 5'NC do VHC no plasmídeo pGEM<sup>®</sup> - T *Easy Vector*. O plasmídeo com o inserto foi obtido através da mini - preparação de plasmídeo, linearizado com a enzima *PstI* e quantificado por espectrofotometria. Foi possível estimar o número de cópias de plasmídeo por microlitro da solução devido ao número de pares de bases e a quantidade do plasmídeo. Foram feitas seis diluições variando de 250.000 cópias/ $\mu$ L à 2,5 cópias/ $\mu$ L. A reprodutibilidade e a especificidade do teste foram avaliadas e uma função de reta foi desenvolvida ( $y = - 0,2929x + 13,157$ ). O uso dessa função de reta fornece valor em cópias/reação. Uma fórmula matemática foi sugerida considerando a eficiência da extração em 50%, utilizando-se 100% do material extraído na reação de transcrição reversa e utilizando 28% do material transcrito na reação de PCR em Tempo Real, obtendo-se o valor em número de cópias/mL (Anexo III) (DUARTE, 2006).

A partir dos valores do Ct obtidos da reação de PCR em Tempo Real, utilizando a função da reta estabelecida pela curva padrão e através da fórmula matemática foi possível determinar os níveis de carga viral em cópias por reação e  $\log_{10}$  nas amostras de soro e de saliva.

As amostras de soro e saliva foram quantificadas através do kit Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor versão 2.0, seguindo orientações do fabricante. No Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor versão 2.0 os resultados de carga viral são expressos em UI/mL, sendo que 1 UI/mL

corresponde a 0,9 cópias/mL do VHC – RNA. Para fins comparativos os resultados de quantificação obtidos a partir do Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor versão 2.0 foram transformados em cópia/mL. Considerando que o limite de detecção do teste varia de  $6,0 \times 10^2$  UI/mL a  $8,5 \times 10^5$  UI/mL, algumas amostras apresentaram o resultado fora do limite de detecção do teste.

Os resultados de quantificação obtidos a partir do PCR em Tempo Real e do Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor versão 2.0, são expressos em números absolutos e em logaritmo de base 10, sendo, esta última, a forma recomendada para interpretação dos resultados, uma vez que pequenas alterações do número absoluto de partículas virais não apresentam relevância biológica ou clínica.

## 5.7 ESFREGAÇO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

Com o objetivo de avaliar a presença de hemácias nas amostras de saliva e excluir uma possível contaminação com sangue, 1mL de cada amostra de saliva foi centrifugada à 5000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi descartado. Foram realizados esfregaços com os precipitados, para obtenção de um maior número de células. As lâminas foram coradas com *Wright*, que é um método para coloração de células de sangue periférico, medula óssea ou para estudo citológico de elementos celulares.

## 5.8 EXAME BUCAL

Todos os pacientes que foram incluídos no estudo foram chamados para serem avaliados por um Cirurgião Dentista, destes 48,2% (14/29) compareceram e foram submetidos a exame extra e intrabucalis. O exame clínico foi baseado na percepção visual, palpação, percussão e sondagem. Os dentes e a mucosa bucal foram examinados na busca por possíveis lesões, doença periodontal e cárie. O índice CPOD, baseado no registro de dentes cariados, perdidos e obturados foi utilizado. A avaliação da doença periodontal enfatizou características teciduais, sondagem e sangramento. Um esquema de classificação foi utilizado para refletir o perfil geral do estado periodontal (Gary Coleman e John F.Nelson, 1993, Principles of Oral Diagnosis): O caso tipo I indica gengivite sem evidência de perda óssea. O caso tipo II é a periodontite inicial caracterizada por gengivite, discreto aumento na profundidade de sulco à sondagem e evidência mínima de perda óssea. O caso tipo III é a periodontite moderada que apresenta profundidade sulcular à sondagem de 5 a 7mm e hemorragia na sondagem.

Observa-se também fibrose gengival, retração, acúmulo de cálculo e mobilidade dental discreta. O caso tipo IV ou periodontite avançada indica perda óssea, mobilidade dental e profundidade sulcular igual ou superior a 8mm.

## 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados gerados no estudo foram cadastrados no banco de dados Epi 2000 (CDC, Atlanta, USA). As análises estatísticas dos dados coletados no estudo foram realizadas com o uso do programa Graphpad Prism version 5.00 *for windows* (GraphPad software, San Diego Califórnia, USA).

A comparação dos níveis de VHC-RNA presentes no soro e na saliva foi realizada através do teste t de *Student*. Foi estabelecido um nível  $\alpha$  de 5% de significância.

A correlação entre os níveis de VHC-RNA presentes no soro e na saliva utilizando a PCR em Tempo Real e o Amplicor<sup>®</sup>, foi realizada com o teste de correlação de Pearson. Foi estabelecido um nível  $\alpha$  de 5% de significância.

A concordância entre os níveis de carga viral do VHC-RNA presentes no soro e na saliva utilizando a PCR em Tempo Real e o Amplicor<sup>®</sup>, foi realizada através da aplicação da metodologia descrita por Bland e Altman. A metodologia proposta por Bland e Altman, 1999, analisa a variabilidade entre dois momentos para medidas repetidas, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade de dois métodos. Os autores sugerem que a variação existente para a diferença entre as medidas é igual à média das diferenças somadas ou subtraídas de duas vezes o desvio padrão das diferenças.

Foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis* para avaliar a diferença entre as médias de carga viral, utilizando a PCR em Tempo Real e o Amplicor<sup>®</sup>, e genótipo do VHC. Foi estabelecido um nível  $\alpha$  de 5% de significância.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo foram analisadas 29 amostras pareadas de soro e saliva de indivíduos portadores da infecção crônica causada pelo VHC. O VHC-RNA foi detectável nas 29 amostras de soro e saliva incluídas no estudo. Destas 41,3% (12/29) do sexo feminino e 58,6% (17/29) do sexo masculino. A média de idade dos pacientes foi de  $49,3 \pm 9,08$  anos.

### 6.2 DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS

Dentre os indivíduos estudados 75,8% (22/29) estão infectados pelo genótipo 1, 13,7% (4/29) pelo genótipo 3 e 10,3% (3/29) pelo genótipo 2.

### 6.3 CARGA VIRAL NO SORO E NA SALIVA ATRAVÉS DA PCR EM TEMPO REAL

A carga viral das 29 amostras pareadas de soro e saliva foram quantificadas através do PCR em Tempo Real. A tabela 1 apresenta os valores de  $Ct$  e o número de cópias por reação das 29 amostras estudadas. Os valores de  $Ct$  encontrados no soro variou de 21,17 a 36,42, e o encontrado na saliva de 28,39 a 41,08.

**Tabela 1:** Resultados das Reações de PCR em Tempo Real expressos em Ct e em nº de cópias/reação em amostras pareadas de soro e saliva.

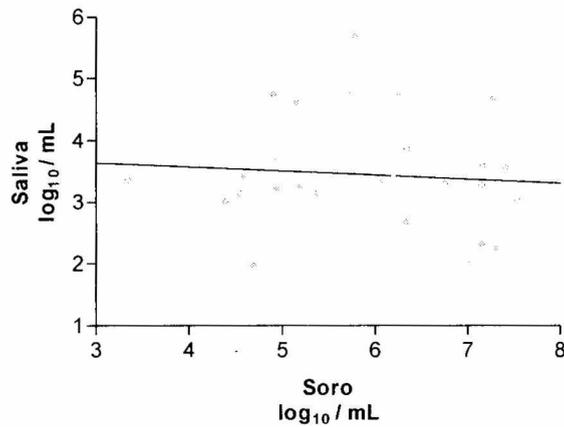
Pacientes	CT do Soro	nº cópias/reação	CT da Saliva	nº cópias/reação
1	23,42	$1,99 \times 10^6$	36,61	$2,69 \times 10^2$
2	26,205	$4,89 \times 10^6$	38,67	$1,47 \times 10^2$
3	24,76	$3,01 \times 10^5$	36,47	67
4	22,995	$7,94 \times 10^5$	31,88	$2,95 \times 10^2$
5	28,08	$3,09 \times 10^5$	28,39	$1,04 \times 10^3$
6	26,69	$2,63 \times 10^6$	36,2	$6,60 \times 10^3$
7	26,435	$1,94 \times 10^4$	31,55	$5,88 \times 10^3$
8	22,51	$5,49 \times 10^4$	35,65	97
9	23,96	$5,01 \times 10^3$	40,83	$1,94 \times 10^2$
10	32,845	$8,51 \times 10^4$	37,5	$6,91 \times 10^4$
11	36,42	$2,04 \times 10^6$	36,35	$5,49 \times 10^2$
12	30,09	$2,18 \times 10^5$	36,66	$3,54 \times 10^2$
13	30,97	$2,57 \times 10^5$	36,8	$8,12 \times 10^3$
14	30,935	$3,63 \times 10^6$	35,1	$5,12 \times 10^2$
15	31,095	$1,38 \times 10^6$	31,59	15
16	32,19	$3,46 \times 10^3$	36,19	$1,47 \times 10^2$
17	29,265	$3,09 \times 10^2$	37,92	$3,23 \times 10^2$
18	29,465	$2,18 \times 10^4$	37,05	$2,63 \times 10^2$
19	23,395	$1,23 \times 10^4$	39,85	$2,39 \times 10^2$
20	31,8	$1,25 \times 10^4$	41,08	$7,41 \times 10^2$
21	22,875	$1,12 \times 10^4$	40,15	$7,94 \times 10^3$
22	27,07	$5,37 \times 10^3$	36,45	$3,63 \times 10^2$
23	28,375	$3,89 \times 10^4$	31,6	$1,12 \times 10^2$
24	21,17	$3,38 \times 10^4$	37,5	$1,99 \times 10^2$
25	28,75	$1,99 \times 10^6$	38,13	30
26	32,28	$6,91 \times 10^3$	37,11	13
27	26,18	$2,88 \times 10^6$	34,6	25
28	23,36	$1,69 \times 10^5$	35,58	$3,01 \times 10^2$
29	30,285	$7,07 \times 10^4$	32,05	$7,94 \times 10^3$

O número de cópias por mililitro de soro e de saliva foi estimado considerando a eficiência da extração de 0,50, sendo utilizado 100% do total extraído na transcrição reversa e 28% na reação de PCR. A tabela 2 apresenta os resultados referentes ao número de cópias/mL e cópias  $\log_{10}$ /mL.

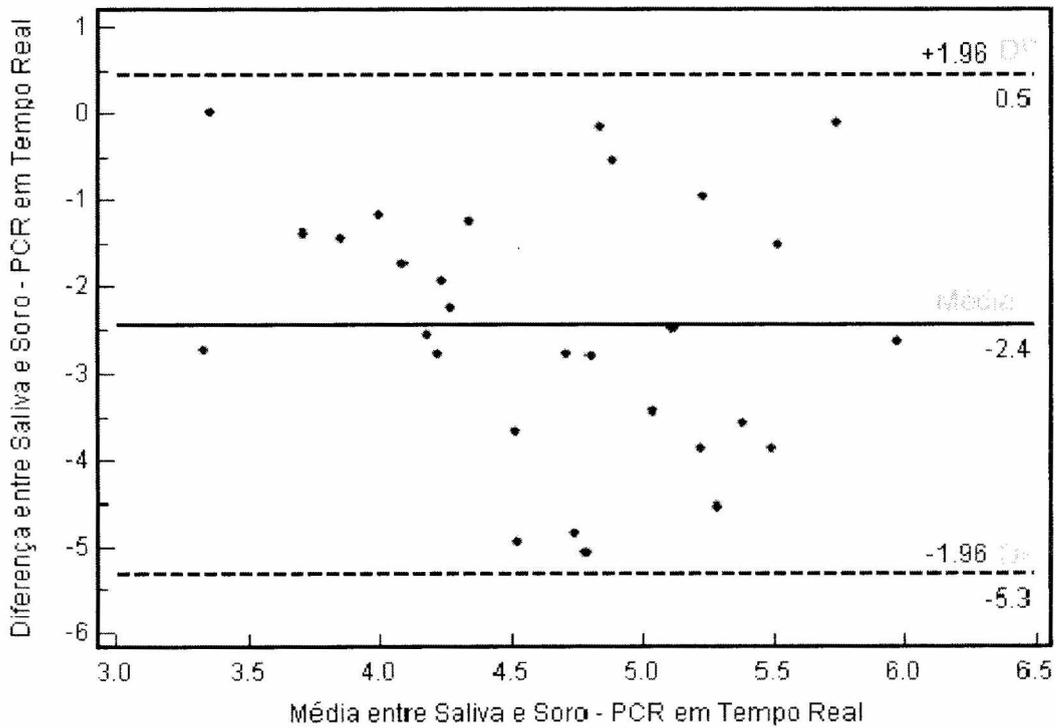
**Tabela 2:** Resultados das Reações de PCR em Tempo Real expressos em número de cópias/mL e cópias  $\log_{10}$ /mL em amostras pareada de soro e saliva.

Pacientes	nºcópias /ml (soro)	Log <sub>10</sub>	nºcópias /ml (saliva)	Log <sub>10</sub>
1	1.42x10 <sup>7</sup>	7.15	1.90x10 <sup>3</sup>	3.28
2	3.49x10 <sup>7</sup>	7.54	1.05x10 <sup>3</sup>	3.02
3	2.15x10 <sup>6</sup>	6.33	4.82x10 <sup>2</sup>	2.68
4	5.67x10 <sup>6</sup>	6.75	2.10x10 <sup>3</sup>	3.32
5	2.20x10 <sup>6</sup>	6.34	7.40x10 <sup>3</sup>	3.87
6	1.88x10 <sup>7</sup>	7.27	4.72x10 <sup>4</sup>	4.67
7	1.39x10 <sup>5</sup>	5.14	4.20x10 <sup>4</sup>	4.62
8	392x10 <sup>5</sup>	5.59	6,98x10 <sup>2</sup>	2.84
9	3.58x10 <sup>4</sup>	4.55	139x10 <sup>3</sup>	3.14
10	6.08x10 <sup>8</sup>	5.78	4.91x10 <sup>5</sup>	5.69
11	1.45x10 <sup>7</sup>	7.16	3.92x10 <sup>3</sup>	3.59
12	1.56x10 <sup>6</sup>	6.19	2.53x10 <sup>3</sup>	3.4
13	1.83x10 <sup>6</sup>	6.26	5.80x10 <sup>4</sup>	4.76
14	2.59x10 <sup>7</sup>	7.41	3.66x10 <sup>3</sup>	3.56
15	9.85x10 <sup>6</sup>	6.99	1.13x10 <sup>2</sup>	2.05
16	2.47x10 <sup>4</sup>	4.39	1.05x10 <sup>3</sup>	3.02
17	2.20x10 <sup>3</sup>	3.34	2.31x10 <sup>3</sup>	3.36
18	1.56x10 <sup>5</sup>	5.19	1.87x10 <sup>3</sup>	3.27
19	8.78x10 <sup>4</sup>	4.94	1.71x10 <sup>3</sup>	3.23
20	8.99x10 <sup>4</sup>	4.95	5.29x10 <sup>3</sup>	3.72
21	8.01x10 <sup>4</sup>	4.9	5.67x10 <sup>4</sup>	4.75
22	3.83x10 <sup>4</sup>	4.58	2.59x10 <sup>3</sup>	3.41
23	2.77x10 <sup>5</sup>	5.44	8.01x10 <sup>2</sup>	2.9
24	2.42x10 <sup>5</sup>	5.38	1.42x10 <sup>3</sup>	3.15
25	1.42x10 <sup>7</sup>	7.15	2.15x10 <sup>2</sup>	2.33
26	4.94x10 <sup>4</sup>	4.69	94	1.97
27	2.06x10 <sup>7</sup>	7.31	1,79x10 <sup>2</sup>	2.25
28	1.21x10 <sup>6</sup>	6.08	2,15x10 <sup>3</sup>	3.33
29	5.05x10 <sup>5</sup>	5.7	5.67x10 <sup>4</sup>	4.75

O nível médio do VHC-RNA encontrado na saliva foi de  $2,8 \times 10^4$  cópias/mL ( $3,44 \log_{10}$ ) e no soro foi de  $5,9 \times 10^6$  cópias/mL ( $5,87 \log_{10}$ ), demonstrando que a carga viral do VHC-RNA na saliva é de aproximadamente  $1,7 \log_{10}$  vezes inferior a carga viral do soro. Os níveis de VHC-RNA presentes na saliva são inferiores aos encontrados no soro, com resultados estatisticamente significante [( $p < 0,0005$ ; intervalo de confiança (1,90 – 2,96); teste *t de Student*). Não foi observada correlação significativa entre os níveis VHC-RNA presentes no soro e na saliva ( $r = -0,81$  e  $p = 0,6752$ ; teste de Correlação de Pearson) (figura 1). Uma avaliação mais informativa da concordância dos níveis de carga viral do VHC-RNA presentes no soro e na saliva, foi obtida através da aplicação da metodologia descrita por Bland e Altman (figura 2).



**Figura 1:** Correlação entre os níveis de carga viral através do PCR em tempo real no soro e na saliva ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) [ $r = -0.081$ ,  $p = 0.6752$ ].



**Figura 2:** Concordância entre os níveis de VHC-RNA na saliva e no soro com resultados da PCR em Tempo Real através da metodologia de Bland-Altman

De acordo com a metodologia de Bland e Altman observamos uma média da diferença entre os fluidos de  $2,43 \log_{10}$  ( $2,99 \log_{10}$  a  $1,87 \log_{10}$ , intervalo de confiança de 95%), com desvio padrão de 1,47. Os limites de concordância encontrados foram: limite superior de  $0,46 \log_{10}$  ( $0,51 \log_{10}$  a  $1,43 \log_{10}$ , com intervalo de confiança de 95%) e inferior  $-5,32 \log_{10}$  ( $-6,29 \log_{10}$  a  $-4,35 \log_{10}$  com intervalo de confiança de 95%) (figura 2).

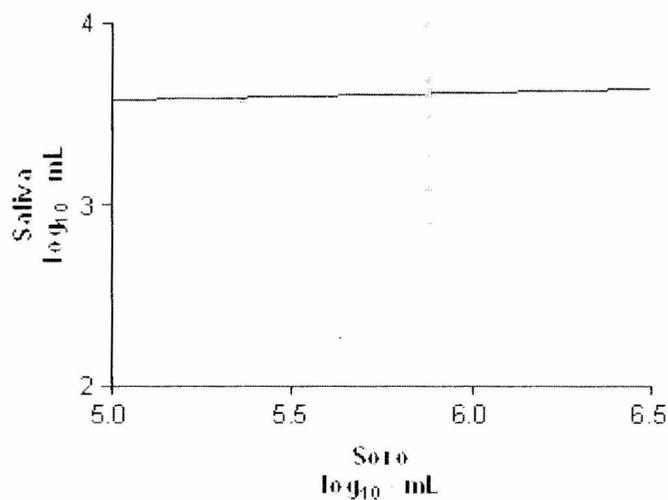
#### 6.4 CARGA VIRAL NO SORO E NA SALIVA ATRAVÉS DO AMPLICOR<sup>®</sup> HCV MONITOR

Foi realizada a comparação entre as amostras de soro e saliva utilizando o teste quantitativo Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor (tabela 3). Foi possível comparar apenas 23 amostras de saliva, devido ao volume insuficiente das mesmas. O nível médio da carga viral encontrada no soro foi de  $1,51 \times 10^5$  cópias/mL ( $5,17 \log_{10}$ ), enquanto na saliva foi de  $7,44 \times 10^3$  cópias/mL ( $3,60 \log_{10}$ ), demonstrando que a carga viral do VHC-RNA na saliva é aproximadamente  $1,6 \log_{10}$  vezes inferior a carga viral do soro. Os níveis de VHC-RNA presentes na saliva são inferiores aos encontrados no soro, com resultados estatisticamente significante [( $p < 0,0005$  intervalo de confiança (1,95 – 2,39); teste *t de Student*]. Não foi observado um coeficiente de correlação significativo entre os dois testes ( $r = 0,018$  e  $p = 0,934$ ; teste de Correlação de Pearson).

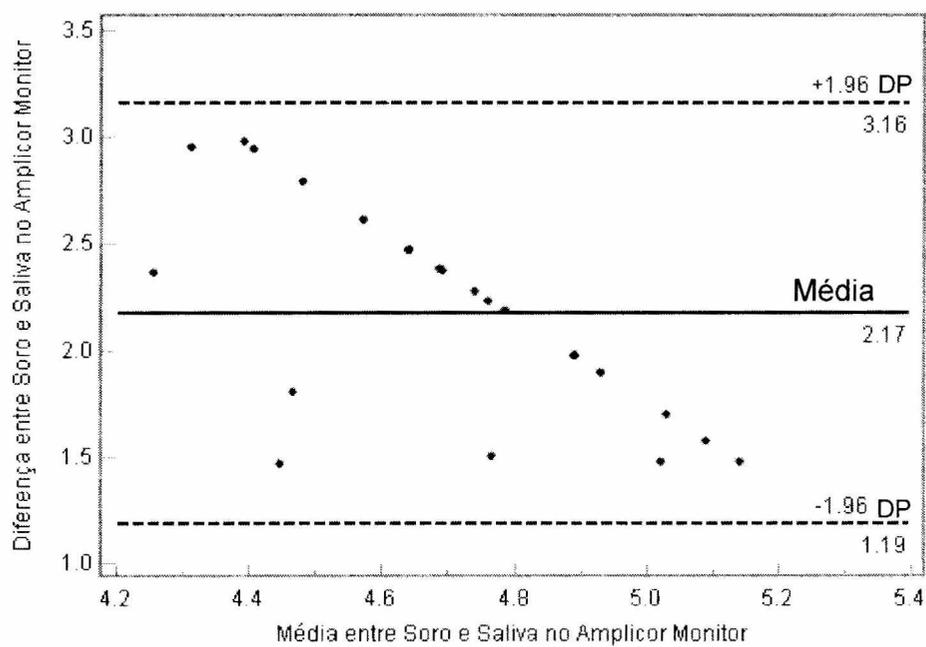
**Tabela 3:** Resultados quantitativos em  $\log_{10}/\text{mL}$  utilizando o teste Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor no soro e na saliva.

Pacientes	AMPLICOR <sup>®</sup> Soro	AMPLICOR <sup>®</sup> Saliva
1	5.88	3.98
2	5.88	3.90
3	5.76	4.28
4	5.88	3.49
5	5.88	2.90
10	5.44	3.07
11	5.88	2.93
13	5.37	3.56
14	5.79	2.83
15	5.88	3.26
16	5.88	3.40
17	5.88	3.60
18	5.52	4.01
19	5.88	4.18
20	5.88	3.90
21	5.88	3.69
22	5.88	3.50
23	5.88	3.08
24	5.88	3.64
25	5.18	3.71
26	5.88	3.40
28	5.88	4.40
29	5.88	4.30

A avaliação realizada através da metodologia de Bland e Altman apresentou uma média da diferença entre os testes de  $2,17 \log_{10}$  ( $-1,95 \log_{10}$  a  $2,39 \log_{10}$ , intervalo de confiança de 95%), com desvio padrão de 0,50. Os limites de concordância encontrados foram: limite superior de  $3,15 \log_{10}$  ( $2,78 \log_{10}$  a  $3,53 \log_{10}$ , com intervalo de confiança de 95%) e inferior  $1,19 \log_{10}$  ( $0,81 \log_{10}$  a  $1,56 \log_{10}$  com intervalo de confiança de 95%) (figura 4).



**Figura 3:** Correlação entre os níveis de carga viral através do Amplicor<sup>®</sup> no soro e na saliva de pacientes (log/mL) [ $r = 0.018$ ,  $p = 0.9347$ ].



**Figura 4:** Concordância entre os níveis de VHC-RNA na saliva e no soro com resultados do Amplicor<sup>®</sup> através da metodologia de Bland-Altman

## 6.5 LÂMINAS COM ESFREGAÇOS DE SALIVA

Foram realizados esfregaços de todas as amostras de saliva e estavam presentes células epiteliais, polimorfos nucleares e algumas bactérias nas amostras de alguns pacientes. Foi observada ausência de hemácias em todas as amostras analisadas, excluindo a possibilidade de contaminação com sangue.

## 6.6 EXAMES BUCAIS

Foram submetidos à avaliação bucal 48,2% (14/29) dos indivíduos estudados, destes foram classificados como doença periodontal tipo I 14,2% (2/14) dos casos, como doença periodontal tipo II 21,4% (3/14) dos casos, como doença periodontal tipo III 21,4% (3/14). Não houve casos de doença periodontal tipo IV e 42,8% (6/14) dos indivíduos avaliados não apresentavam sinais de doença periodontal.

Na tabela 4 está registrado o dado de quantificação obtido através do Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor e da PCR em Tempo Real e os exames bucais dos pacientes avaliados. Os níveis médio em  $\log_{10}$  do VHC-RNA nos pacientes com doença periodontal tipo I foi de 3,50  $\log_{10}$  utilizando a PCR em Tempo Real e de 3,93  $\log_{10}$  utilizando o Amplicor<sup>®</sup>, nos pacientes com doença periodontal tipo II foi de 4,12  $\log_{10}$  utilizando a PCR em Tempo Real e de 3,74  $\log_{10}$  utilizando o Amplicor<sup>®</sup>, nos pacientes com doença periodontal tipo III foi de 3,22  $\log_{10}$  utilizando a PCR em Tempo Real e de 3,48  $\log_{10}$  utilizando o Amplicor<sup>®</sup>, enquanto nos pacientes que não apresentavam sinais de doença periodontal foi de 3,44  $\log_{10}$  utilizando a PCR em Tempo Real e de 3,72  $\log_{10}$  utilizando o Amplicor<sup>®</sup>.

**Tabela 4:** Resultado da avaliação bucal e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor<sup>®</sup> expressos em log<sub>10</sub>.

Avaliação Bucal	Carga viral (log <sub>10</sub> ) do VHC-RNA na saliva	
	PCR em tempo real	Amplicor <sup>®</sup>
Doença periodontal tipo I	3,72	3,69
	3,27	4,18
Doença periodontal tipo II	3,14	AI*
	5,69	2,93
	3,36	4,01
Doença periodontal tipo III	2,84	3,07
	3,59	NEG**
	3,23	3,9
Ausência de Doença periodontal	2,68	4,28
	3,87	2,9
	4,75	3,5
	2,9	3,64
	3,15	3,71
	3,33	4,3

\*AI amostra insuficiente;

\*\*NEG negativo.

## 6.7 GENÓTIPOS E QUANTIFICAÇÃO DO VHC-RNA

### 6.7.1 Genótipos e quantificação do VHC-RNA no soro através do Amplicor<sup>®</sup> e da PCR em Tempo Real

Está registrado na tabela 5 a carga viral do VHC-RNA no soro através dos testes do Amplicor<sup>®</sup> e da PCR em Tempo Real de acordo com os genótipos do VHC. O nível médio do VHC-RNA observado no genótipo 1 foi de 5,84 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e de 6,13 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real, no genótipo 3 foi de 5,57 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e de 5,30 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real e no genótipo 2 foi de 5,64 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e 4,78 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os níveis médio do VHC-RNA e genótipo do VHC no soro (H = 11,05 e p = 0,0504; teste *Kruskal-Wallis*).

**Tabela 5:** Resultado de genótipos e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor nas amostras de soro.

Pacientes	Genótipos	Amplicor <sup>®</sup>	Real time PCR
1	3	5.88	7.15
2	1	5.88	7.54
3	1	5.76	6.33
4	1	5.88	6.75
5	1	5.88	6.34
6	1	5.88	7.27
7	3	5.46	5.14
8	3	5.44	5.59
9	1	5.88	4.55
10	1	5.88	5.78
11	1	5.88	7.16
12	1	5.37	6.19
13	1	5.79	6.26
14	1	5.88	7.41
15	1	5.88	6.99
16	2	5.88	4.39
17	3	5.52	3.34
18	1	5.88	5.19
19	1	5.88	4.94
20	1	5.88	4.95
21	1	5.88	4.90
22	2	5.88	4.58
23	1	5.88	5.44
24	2	5.18	5.38
25	1	5.88	7.15
26	1	5.88	4.69
27	1	5.88	7.31
28	1	5.88	6.08
29	1	5.73	5.70

### 6.7.2 Genótipos e quantificação do VHC-RNA na saliva através do Amplicor<sup>®</sup> e da PCR em Tempo Real

Está registrado na tabela 6 a carga viral do VHC-RNA na saliva através dos testes do Amplicor<sup>®</sup> e da PCR em Tempo Real de acordo com os genótipos do VHC. O nível médio do VHC-RNA observado no genótipo 1 foi de 3,62 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e de 3,42 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real, no genótipo 3 foi de 3,69 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e de 3,16 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real e no genótipo 2 foi de 4,46 log<sub>10</sub> utilizando o Amplicor<sup>®</sup> e 3,19 log<sub>10</sub> utilizando a PCR em Tempo Real. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os níveis

médio do VHC-RNA e genótipo do VHC na saliva ( $H = 4,85$  e  $p = 0,433$ ; teste *Kruskal-Wallis*).

**Tabela 6:** Resultado de genótipos e dos dados quantitativos dos testes da PCR em Tempo Real e Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor nas amostras de saliva.

Pacientes	Genótipos	Amplicor <sup>®</sup>	Real time PCR
1	3	3.98	3.28
2	1	3.90	3.02
3	1	4.28	2.68
4	1	3.49	3.32
5	1	2.90	3.87
10	3	3.07	2.84
11	1	2.93	5.69
13	1	3.56	3.40
14	1	2.83	4.76
15	1	3.26	3.56
16	1	3.40	2.05
17	2	3.60	3.02
18	3	4.01	3.36
19	1	4.18	3.27
20	1	3.90	3.23
21	1	3.69	3.72
22	1	3.50	4.75
23	2	3.08	3.41
24	1	3.64	2.90
25	2	3.71	3.15
26	1	3.40	2.33
28	1	4.40	2.25
29	1	4.30	3.33

## 7 DISCUSSÃO

A infecção causada pelo VHC possui altas taxas de mortalidade e morbidade, devido a sua evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular. A elevada prevalência, a ausência de vacina e a limitada resposta terapêutica, tornam fundamental o estudo da infecção pelo VHC.

A transmissão do VHC ocorre preferencialmente por via parenteral, sendo que os indivíduos que receberam transfusão sanguínea no período anterior a 1990 e usuários de drogas injetáveis são os mais importantes grupos sob risco para infecção pelo VHC. Porém alguns indivíduos infectados pelo VHC desconhecem como adquiriram a infecção, o que indica a existência de vias de transmissão desconhecidas, demonstrando a importância de investigar a saliva como possível via de transmissão do VHC.

Os estudos publicados na literatura científica demonstram a possibilidade de detecção do VHC-RNA na saliva em indivíduos com o VHC-RNA detectável no soro, o que sugere a possibilidade de transmissão do VHC através da saliva. Entretanto, considerando a baixa prevalência do VHC na população geral (FOCACCIA , *et al.*, 1998; SILVA , *et al.*, 1995; SOUTO , *et al.*, 1999; ZARIFE, *et al.*, 2006b) e a baixa prevalência de transmissão sexual (ROONEY&GILSON, 1998), a transmissão do VHC através da saliva precisa ser investigada.

Os estudos com o objetivo de investigar a presença e a carga viral do VHC-RNA na saliva podem contribuir para o desenvolvimento de métodos diagnósticos menos invasivos e mais econômicos. Esses estudos podem contribuir ainda na compreensão do papel da saliva na transmissão da hepatite C e no desenvolvimento de novas drogas utilizadas no tratamento contra o VHC.

Diversos estudos apresentam diferentes hipóteses para explicar a presença do VHC-RNA em diversos fluidos corpóreos, incluindo a saliva, em indivíduos com VHC-RNA detectável no soro (CHEN , *et al.*, 1995; FABRIS , *et al.*, 1999; HERMIDA , *et al.*, 2002; LINS, *et al.*, 2005; MARIETTE , *et al.*, 1995; TAKAMATSU, *et al.*, 1990), assim como vários autores buscaram investigar a origem do VHC-RNA na saliva, Ferreiro *et al.*, 2005 sugerem que a contaminação com sangue seja responsável pela presença do VHC-RNA na saliva, no entanto a maioria dos estudos demonstram que a presença do VHC-RNA na saliva é independente da contaminação com sangue oculto oriundos de lesões na mucosa bucal (FABRIS, *et al.*, 1999; HERMIDA, *et al.*, 2002; LIOU , *et al.*, 1992). Maticic *et al.*, 2001 sugerem que o VHC-RNA presente na saliva

se origina do fluido crevicular, mas alguns estudos observaram a presença do VHC-RNA na saliva em indivíduos desdentados. Outros estudos demonstram que o VHC-RNA na saliva está presente independente de doença periodontal (LINS, *et al.*, 2005; ROY, *et al.*, 1998). Alguns autores sugerem que a detecção do VHC-RNA na saliva seja através da presença de PBMCs (MATICIC, *et al.*, 2001). No entanto, Young *et al.*, 1993 não observaram correlação entre a presença do VHC-RNA nas PBMCs e em amostras de saliva. Alguns pesquisadores demonstram que o VHC-RNA pode ser detectado em glândulas salivares (ARRIETA, *et al.*, 2001; TAKAMATSU, *et al.*, 1992), elucidando o papel das glândulas salivares na disseminação do vírus na saliva. No entanto, Taliani *et al.*, 1997, estudaram 20 pacientes italianos e não encontraram evidência do VHC-RNA em glândulas salivares.

Os estudos publicados na literatura que buscaram investigar a origem do VHC-RNA na saliva são contraditórios (ARRIETA, *et al.*, 2001; FERREIRO, *et al.*, 2005; MATICIC, *et al.*, 2001; TAKAMATSU, *et al.*, 1992; TALIANI, *et al.*, 1997; YOUNG, *et al.*, 1993). A baixa carga viral do VHC-RNA presentes na saliva quando comparado com o soro e a ausência de correlação entre a carga viral observada no soro e na saliva pode estar correlacionada com a origem do VHC-RNA encontrado na saliva, ou ainda com o estado de saúde bucal dos indivíduos infectados pelo VHC. Dos 29 indivíduos incluídos neste estudo apenas 48,2% foram avaliados quanto ao estado de saúde bucal, dificultando a avaliação da correlação entre a carga viral do VHC-RNA na saliva e da presença ou ausência de doença periodontal.

Alguns pesquisadores buscaram investigar a correlação entre a carga viral no soro e a detecção do VHC-RNA na saliva (EIREA, *et al.*, 2005; HERMIDA, *et al.*, 2002; LINS, *et al.*, 2005; WANG, *et al.*, 2006). Esses estudos mostram-se contraditórios, a maioria dos trabalhos publicados na literatura demonstraram a correlação entre a presença do VHC-RNA na saliva e a carga viral no soro, com resultados estatisticamente significantes (EIREA, *et al.*, 2005; HERMIDA, *et al.*, 2002; WANG, *et al.*, 2006). No entanto, foi demonstrado por Lins *et al.*, 2005, que a presença do VHC-RNA na saliva é independente da carga viral no soro e da presença de patologias bucais nos indivíduos infectados pelo VHC.

No presente estudo utilizamos dois métodos quantitativos a PCR em Tempo Real e o Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor e obtemos resultados similares, indicando que a possibilidade de quantificação do VHC-RNA na saliva e que a sua correlação com o soro são independentes dos métodos quantitativos utilizados para avaliar a carga viral na

saliva. Nesse trabalho foi observado que a média da carga viral na saliva foi de 1,70  $\log_{10}$  vezes inferior ao observado no soro utilizando a metodologia de PCR em Tempo Real. Enquanto, utilizando o teste Amplicor<sup>®</sup> HCV Monitor foi observado que a média da carga viral na saliva foi de 1,60  $\log_{10}$  vezes inferior ao observado no soro. A carga viral do VHC-RNA na saliva foi estatisticamente inferior à carga viral do VHC-RNA no soro, concordando com os estudos publicados na literatura (NUMATA, *et al.*, 1993; REY, *et al.*, 2001; SUZUKI, *et al.*, 2005; TALIANI, *et al.*, 1997). Os estudos prévios que correlacionaram a carga viral do VHC-RNA na saliva e no soro demonstram a ausência de correlação entre a carga viral observada na saliva e no soro (REY, *et al.*, 2001; SUZUKI, *et al.*, 2005), similar ao observado no presente trabalho.

A baixa carga viral do VHC-RNA encontrada na saliva e a ausência de correlação entre a carga viral observado na saliva e no soro podem ser explicados por diversos fatores, dentre eles está o estado de saúde bucal do indivíduo infectado pelo VHC, a origem do VHC-RNA encontrado na saliva e a possível presença de inibidores da reação de PCR. Por exemplo, Pawlotsky *et al.*, 1999 sugerem a existência de inibidores da PCR na saliva, o que poderia influenciar nos baixos níveis de carga viral do VHC-RNA observados na saliva.

No presente estudo avaliamos também a diferença entre a carga viral do VHC-RNA na saliva e no soro e o genótipo do VHC e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis médio do VHC-RNA saliva e no soro e genótipo do VHC, demonstrando que o genótipo do VHC não está relacionado com os níveis encontrados na saliva e no soro.

A possibilidade de detecção e quantificação do VHC-RNA na saliva demonstra que a saliva pode ser utilizada como fluido corpóreo alternativo para avaliar a presença e quantificação do VHC-RNA em estudos epidemiológicos ou em grupos de indivíduos impossibilitados de realizar coleta de sangue, porém não para fins diagnósticos. A coleta da saliva não é invasiva, possui um baixo custo e é considerada mais fácil e rápida quando comparada com a coleta de sangue. A utilização da saliva como método de detecção e quantificação do VHC-RNA é de grande interesse, pois pode trazer benefícios para grupos de pacientes onde existam dificuldades de coleta de sangue.

Embora diversos estudos tenham demonstrado a possibilidade de detecção do VHC-RNA na saliva, o mecanismo de transmissão através deste fluido não é conhecido. Mastromatteo *et al.*, 2001 sugerem que a presença do VHC-RNA na saliva tenha papel importante na transmissão intrafamiliar. No entanto alguns estudos

buscaram investigar a transmissão entre casais e foi observado baixo risco de transmissão (FABRIS, *et al.*, 1999; WANG, *et al.*, 1992). Esses dados demonstram que a transmissão do VHC-RNA na saliva deve ser incomum, e isso pode ser devido à baixa carga viral do VHC-RNA encontrados na saliva. Os dados obtidos no presente estudo e os dados publicados na literatura científica demonstram a necessidade de realização de estudos para elucidar o papel da saliva na transmissão do VHC.

## 9 CONCLUSÃO

1 - É possível quantificar o VHC-RNA na saliva de pacientes infectados pelo VHC.

2 - A carga viral do VHC-RNA encontrada na saliva é estatisticamente inferior a observada no soro.

3 - Não foi observada correlação entre a carga viral do VHC-RNA presente no soro e na saliva dos pacientes infectados pelo VHC.

## 10 PERSPECTIVAS

1 - Realizar estudos epidemiológicos para um melhor entendimento da importância da saliva como via de transmissão para o VHC.

2 - Realizar estudos utilizando maior número de amostras e grupo controle bem estabelecido.

3 - Desenvolver uma curva padrão para ser utilizada na reação de PCR em Tempo Real, em nosso laboratório, permitindo a realização de testes quantitativos.

4 - Realizar estudos de cinética viral, investigando os níveis de VHC-RNA na saliva e no soro antes e depois da terapia com antivirais.

5 - Realizar estudos com o objetivo de investigar a presença de possíveis inibidores do VHC na saliva e verificar se existe diferença estrutural do VHC presente na saliva em relação ao VHC presente no soro dos indivíduos infectados pelo VHC.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABE, K.&G. INCHAUSPE. Transmission of hepatitis C by saliva. **Lancet**, v.337, n.8735, Jan 26, p.248. 1991.

ABE, K., *et al.* Experimental transmission of non-A, non-B hepatitis by saliva. **J Infect Dis**, v.155, n.5, May, p.1078-9. 1987.

ACKERMAN, Z., *et al.* Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. **J Viral Hepat**, v.7, n.2, Mar, p.93-103. 2000.

ALLWRIGHT, S., *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis B, hepatitis C, and HIV and risk factors in Irish prisoners: results of a national cross sectional survey. **Bmj**, v.321, n.7253, Jul 8, p.78-82. 2000.

ALTER, H. J. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: the hepatitis C virus in current perspective. **Ann Intern Med**, v.115, n.8, Oct 15, p.644-9. 1991.

ALTER, H. J., *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **N Engl J Med**, v.321, n.22, Nov 30, p.1494-500. 1989.

AMADO, L. A., *et al.* Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.2, Mar, p.149-55. 2006.

AMARAPURKAR, D. Natural history of hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol Hepatol**, v.15 Suppl, May, p.E105-10. 2000.

ARRIETA, J. J., *et al.* In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. **Am J Pathol**, v.158, n.1, Jan, p.259-64. 2001.

BELLO, P. Y., *et al.* Assessment of a hepatitis C virus antibody assay in saliva for epidemiological studies. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.17, n.8, Aug, p.570-2. 1998.

BLAND, J. M.&D. G. ALTMAN. Measuring agreement in method comparison studies. **Stat Methods Med Res**, v.8, n.2, Jun, p.135-60. 1999.

BUKH, J., *et al.* Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin Liver Dis**, v.15, n.1, Feb, p.41-63. 1995.

CALDWELL, S. H., *et al.* Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation. **Liver Transpl Surg**, v.2, n.2, Mar, p.124-9. 1996.

CAMERON, S. O., *et al.* Detection of antibodies against hepatitis C virus in saliva: a marker of viral replication. **J Viral Hepat**, v.6, n.2, Mar, p.141-4. 1999.

CAMPIOTTO, S., *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.1, Jan, p.41-9. 2005.

CARROZZO, M., *et al.* Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. **J Oral Pathol Med**, v.25, n.10, Nov, p.527-33. 1996.

CHAN, S. W., *et al.* Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **J Gen Virol**, v.73 ( Pt 5), May, p.1131-41. 1992.

CHEN, M., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. **J Med Virol**, v.45, n.2, Feb, p.223-6. 1995.

CHEN, S. L.&T. R. MORGAN. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**, v.3, n.2, p.47-52. 2006.

CHOO, Q. L., *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, n.4902, Apr 21, p.359-62. 1989.

CLARKE, B. Molecular virology of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v.78 ( Pt 10), Oct, p.2397-410. 1997.

COCK DE, L., *et al.* Correlation between detection of antibodies against hepatitis C virus in oral fluid and hepatitis C virus RNA in serum. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, n.8, Aug, p.566-8. 2005.

COLIN, C., *et al.* Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. **J Viral Hepat**, v.8, n.2, Mar, p.87-95. 2001.

CONSENSUS, S. **A F E F Conference on treatment of Hepatitis C**. 2002. Paris. 27-28 p.

COUZIGOU, P., *et al.* Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. **Gut**, v.34, n.2 Suppl, p.S59-60. 1993.

DAVIDSON, F., *et al.* Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. **J Gen Virol**, v.76 ( Pt 5), May, p.1197-204. 1995.

DE COCK, L., *et al.* Detection of HCV antibodies in oral fluid. **J Virol Methods**, v.122, n.2, Dec 15, p.179-83. 2004.

DICKSON, R. C. Clinical manifestations of hepatitis C. **Clin Liver Dis**, v.1, n.3, Nov, p.569-85. 1997.

DONAHUE, J. G., *et al.* The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.327, n.6, Aug 6, p.369-73. 1992.

DUARTE, C. A. B. **Deteção e Quantificação do Vírus da Hepatite C através de RT-PCR em Tempo-Real**. 2006. Curitiba (Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Paraná )

DUFFEY, D. C., *et al.* Oral lichen planus and its association with squamous cell carcinoma: an update on pathogenesis and treatment implications. **Laryngoscope**, v.106, n.3 Pt 1, Mar, p.357-62. 1996.

DUSHEIKO, G. M., *et al.* Hepatitis C virus transmitted by human bite. **Lancet**, v.336, n.8713, Aug 25, p.503-4. 1990.

EIREA, M., *et al.* Detection of HCV-RNA in saliva of HIV-HCV coinfecting patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.21, n.12, Dec, p.1011-5. 2005.

ELSANA, S., *et al.* HCV antibodies in saliva and urine. **J Med Virol**, v.55, n.1, May, p.24-7. 1998.

FABRIS, P., *et al.* High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. **Infection**, v.27, n.2, Mar-Apr, p.86-91. 1999.

FARCI, P. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [Science 1989;244:359-362]. **J Hepatol**, v.36, n.5, May, p.582-5. 2002.

FARCI, P.&R. H. PURCELL. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Semin Liver Dis**, v.20, n.1, p.103-26. 2000.

FEINSTONE, S. M., *et al.* Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl J Med**, v.292, n.15, Apr 10, p.767-70. 1975.

FERREIRA-GONZALEZ, A.&M. L. SHIFFMAN. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. **Semin Liver Dis**, v.24 Suppl 2, p.9-18. 2004.

FERREIRO, M. C., *et al.* Transmission of hepatitis C virus by saliva? **Oral Dis**, v.11, n.4, Jul, p.230-5. 2005.

FIGUEIREDO, J. F., *et al.* Transmission of hepatitis C virus but not human immunodeficiency virus type 1 by a human bite. **Clin Infect Dis**, v.19, n.3, Sep, p.546-7. 1994.

FOCACCIA, R., *et al.* Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. **Braz J Infect Dis**, v.2, n.6, Dec, p.269-284. 1998.

FRIED, M. W., *et al.* Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.102, n.4 Pt 1, Apr, p.1306-8. 1992.

GONCALVES, P. L., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. **Braz J Infect Dis**, v.9, n.1, Feb, p.28-34. 2005.

GROTE, M., *et al.* Hepatitis C virus (HCV)-infection and oral lichen planus. **J Hepatol**, v.29, n.6, Dec, p.1034-5. 1998.

HARLE, J. R., *et al.* [Identifying hepatitis C virus by the gene amplification technique in the saliva of patients for whom the search is simultaneously negative in their serum: 9 cases]. **Rev Med Interne**, v.14, n.10, p.1005. 1993.

HEINTGES, T.&J. R. WANDS. Hepatitis C virus: epidemiology and transmission. **Hepatology**, v.26, n.3, Sep, p.521-6. 1997.

HERMIDA, M., *et al.* Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. **J Virol Methods**, v.101, n.1-2, Mar, p.29-35. 2002.

HSU, H. H., *et al.* Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. **Hepatology**, v.14, n.5, Nov, p.763-7. 1991.

JUDD, A., *et al.* Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. **J Med Virol**, v.71, n.1, Sep, p.49-55. 2003.

KAGE, M., *et al.* Hepatitis C virus RNA present in saliva but absent in breast-milk of the hepatitis C carrier mother. **J Gastroenterol Hepatol**, v.12, n.7, Jul, p.518-21. 1997.

KILPI, A., *et al.* Studies of the inflammatory process and malignant potential of oral mucosal lichen planus. **Aust Dent J**, v.41, n.2, Apr, p.87-90. 1996.

KOMIYAMA, K., *et al.* Detection of hepatitis C virus (HCV)-RNA in saliva and gastric juice. **Adv Exp Med Biol**, v.371B, p.995-7. 1995.

HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment. **Lancet**, v.338, n.8766, Aug 31, p.572-3. 1991.

KUO, G., *et al.* An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v.244, n.4902, Apr 21, p.362-4. 1989.

LAUER, G. M.&B. D. WALKER. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.345, n.1, Jul 5, p.41-52. 2001.

LEVI, J. E., *et al.* Three cases of infection with hepatitis C virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. **J Clin Microbiol**, v.40, n.7, Jul, p.2645-7. 2002.

LINS, L., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. **J Med Virol**, v.77, n.2, Oct, p.216-20. 2005.

LIOU, T. C., *et al.* Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. **J Med Virol**, v.37, n.3, Jul, p.197-202. 1992.

LOCK, G., *et al.* Hepatitis C - contamination of toothbrushes: myth or reality? **J Viral Hepat**, v.13, n.9, Sep, p.571-3. 2006.

MACKAY, I. M., *et al.* Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.6, Mar 15, p.1292-305. 2002.

MARIETTE, X., *et al.* Hepatitis C virus in saliva. **Ann Intern Med**, v.122, n.7, Apr 1, p.556. 1995.

MATICIC, M., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. **J Periodontol**, v.72, n.1, Jan, p.11-6. 2001.

MCINTYRE, P. G., *et al.* Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.15, n.11, Nov, p.882-4. 1996.

MCOMISH, F., *et al.* Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J Clin Microbiol**, v.32, n.4, Apr, p.884-92. 1994.

MORADPOUR, D.&H. E. BLUM. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver Int**, v.24, n.6, Dec, p.519-25. 2004.

NAGAO, Y., *et al.* High prevalence of hepatitis C virus antibody and RNA in patients with oral cancer. **J Oral Pathol Med**, v.24, n.8, Sep, p.354-60. 1995.

NUMATA, N., *et al.* Demonstration of hepatitis C virus genome in saliva and urine of patients with type C hepatitis: usefulness of the single round polymerase chain reaction method for detection of the HCV genome. **J Med Virol**, v.41, n.2, Oct, p.120-8. 1993.

OGASAWARA, S., *et al.* Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. **Lancet**, v.341, n.8844, Feb 27, p.561. 1993.

OHOKA, S., *et al.* Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. **Hepatol Res**, v.27, n.1, Sep, p.23-29. 2003.

OVERBERGH, L., *et al.* The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **J Biomol Tech**, v.14, n.1, Mar, p.33-43. 2003.

PAWLOTSKY, J. M. Diagnostic tests for hepatitis C. **J Hepatol**, v.31 Suppl 1, p.71-9. 1999.

PAWLOTSKY, J. M., *et al.* Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. **Hepatology**, v.19, n.4, Apr, p.841-8. 1994.

Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. **Ann Intern Med**, v.122, n.3, Feb 1, p.169-73. 1995.

PENIN, F., *et al.* Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. **J Biol Chem**, v.279, n.39, Sep 24, p.40835-43. 2004.

POYNARD, T., *et al.* Viral hepatitis C. **Lancet**, v.362, n.9401, Dec 20, p.2095-100. 2003.

PRINCE, A. M.&D. JASS. Kinetic studies on the direct solid phase radioimmunoassay for hepatitis B antigen. **Vox Sang**, v.26, n.3, Mar, p.209-21. 1974.

PUCHHAMMER-STOCKL, E., *et al.* Prevalence of hepatitis-C virus RNA in serum and throat washings of children with chronic hepatitis. **J Med Virol**, v.43, n.2, Jun, p.143-7. 1994.

REY, D., *et al.* Quantitation of hepatitis C virus RNA in saliva and serum of patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. **J Med Virol**, v.63, n.2, Feb, p.117-9. 2001.

ROONEY, G.&R. J. GILSON. Sexual transmission of hepatitis C virus infection. **Sex Transm Infect**, v.74, n.6, Dec, p.399-404. 1998.

ROSEN, H. R., *et al.* Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. **Hepatology**, v.35, n.1, Jan, p.190-8. 2002.

ROY, K.&J. BAGG. Hepatitis C virus and oral disease: a critical review. **Oral Dis**, v.5, n.4, Oct, p.270-7. 1999.

ROY, K. M., *et al.* Hepatitis C virus in saliva of haemophiliac patients attending an oral surgery unit. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.34, n.2, Apr, p.162-5. 1996.

Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. **J Med Virol**, v.54, n.4, Apr, p.271-5. 1998.

SARRAZIN, C., *et al.* Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. **J Clin Microbiol**, v.44, n.3, Mar, p.729-37. 2006.

SAVOLDI, E., *et al.* HCV-RNA occurrence in saliva of odontoiatric HCV seropositive patients. **Minerva Stomatol**, v.50, n.3-4, Mar-Apr, p.71-4. 2001.

SCHIFF, E. R., *et al.* New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. **Semin Liver Dis**, v.19 Suppl 1, p.3-15. 1999.

SHERMAN, K. E., *et al.* The use of oral fluid for hepatitis C antibody screening. **Am J Gastroenterol**, v.89, n.11, Nov, p.2025-7. 1994.

SILVA, L., *et al.* [Prevalence of hepatitis C virus in urban and rural populations of northeast Brazil-pilot study]. **Arq Gastroenterol**, v.32, n.4, Oct-Dec, p.168-71. 1995.

SILVA, L. K., *et al.* Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.62, n.2, Feb, p.257-60. 2000.

- SMUTS, H. E.&J. KANNEMEYER. Genotyping of hepatitis C virus in South Africa. **J Clin Microbiol**, v.33, n.6, Jun, p.1679-81. 1995.
- SOUTO, F. J., *et al.* Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, n.6, Nov-Dec, p.719-23. 1999.
- STRAUSS, E. [Hepatitis C]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, n.1, Jan-Feb, p.69-82. 2001.
- STUMPF, M. P.&O. G. PYBUS. Genetic diversity and models of viral evolution for the hepatitis C virus. **FEMS Microbiol Lett**, v.214, n.2, Sep 10, p.143-52. 2002.
- SUGIMURA, H., *et al.* Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function. **Infection**, v.23, n.5, Sep-Oct, p.258-62. 1995.
- SUZUKI, T., *et al.* Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. **J Clin Microbiol**, v.43, n.9, Sep, p.4413-7. 2005.
- TAKAMATSU, K., *et al.* Hepatitis C virus RNA in saliva. **Lancet**, v.336, n.8729, Dec 15, p.1515. 1990.
- Hepatitis C virus propagates in salivary glands. **J Infect Dis**, v.165, n.5, May, p.973-4. 1992.
- TALIANI, G., *et al.* Hepatitis C virus infection of salivary gland epithelial cells. Lack of evidence. **J Hepatol**, v.26, n.6, Jun, p.1200-6. 1997.
- THALER, M. M., *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus. **Lancet**, v.338, n.8758, Jul 6, p.17-8. 1991.
- TREMOLADA, F., *et al.* Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. **Ann Intern Med**, v.114, n.4, Feb 15, p.277-81. 1991.
- TUCKER, S. C.&I. H. COULSON. Lichen planus is not associated with hepatitis C virus infection in patients from north west England. **Acta Derm Venereol**, v.79, n.5, Sep, p.378-9. 1999.
- URDEA, M. S., *et al.* Hepatitis C--diagnosis and monitoring. **Clin Chem**, v.43, n.8 Pt 2, Aug, p.1507-11. 1997.
- VAN DER MEIJ, E. H.&I. VAN DER WAAL. Hepatitis C virus infection and oral lichen planus: a report from The Netherlands. **J Oral Pathol Med**, v.29, n.6, Jul, p.255-8. 2000.
- VAN DER POEL, C. L., *et al.* Hepatitis C virus six years on. **Lancet**, v.344, n.8935, Nov 26, p.1475-9. 1994.

VAN DOORNUM, G. J., *et al.* Evaluation of hepatitis C antibody testing in saliva specimens collected by two different systems in comparison with HCV antibody and HCV RNA in serum. **J Med Virol**, v.64, n.1, May, p.13-20. 2001.

WANG, C. C., *et al.* High serum hepatitis C virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection. **J Infect Dis**, v.193, n.5, Mar 1, p.672-6. 2006.

WANG, J. T., *et al.* Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with post-transfusion hepatitis C infection. **Lancet**, v.337, n.8732, Jan 5, p.48. 1991.

Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. **J Med Virol**, v.36, n.1, Jan, p.28-31. 1992.

WASLEY, A.&M. J. ALTER. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis**, v.20, n.1, p.1-16. 2000.

YOUNG, K. C., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. **J Med Virol**, v.41, n.1, Sep, p.55-60. 1993.

ZARIFE, M. A., *et al.* [Detection of genotype 4 of the hepatitis C virus in Salvador, BA]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, n.6, Nov-Dec, p.567-9. 2006a.

Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, n.7, Jul, p.663-8. 2006b.





{qnd14} .....|\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|  
 r) compartilha(ou) escova de dentes {escovadent} |\_| (0=n; 1=s; 9=ns)

Obs.: Proceder o questionário fechado.

#### IV. Hábitos

1. {Etilista} .....|\_| (0=n; 1=s; 9=ns)
- {Tempoetil} .....|\_|\_| (anos)
- {Tipo pref} .....|\_| (0=fermentada; 1=destilada; 2=indiferente)
- {Dose sem}anal .....|\_| (0=esporadicamente; 1=1 garrafa; 2=mais de 2 garrafas)

#### V. Antecedentes familiares e contato

1. Histórico de hepatopatia na família {hepato fam} |\_| (0=n; 1=s; 9=ns)
- 1.1 Associado a {álcool} |\_| (0=n; 1=s; 9=ns)

#### VI. Condições sócio-econômicas

1. Número de pessoas resid. no mesmo domicílio |\_|\_|
- 1.1 {Renda} familiar mensal |\_|\_|\_|\_| SM



### C. QUESTIONÁRIO FECHADO

#### I. Identificação

1. Código do paciente {cod} .....
2. {Iniciais} .....
3. Data da entrevista {dtentrev} .....   /   /

#### II. Dados epidemiológicos - Parte II

1. Contato com pessoas portadoras de HCV {ctporthcv}  (0=n; 1=s; 9=ns)
- 1.1 Tem suspeita de transmissão por contato {suspcotato}  (0=n; 1=s; 9=ns)
2. Já teve experiência homossexual {exphomo} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)
3. Como você define sua {pratica sex}ual .....  (0=heterossexual;  
1=homossexual;  
2=bisexual)
4. Sexo anal (ativo)..... (0=n; 1=s/ativo;2=s/passivo 9=ns)
5. Relação sexual durante o período menstrual {menst}  (0=n; 1=s; 9=ns)
6. Já teve {DST} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
{qual16} | \_\_\_\_\_  
{qnd16} | \_\_\_\_\_  
.....   /   /
7. Número de parceiros nos últimos 12 meses {numparc}  (0=apenas 1;  
1=2-5;3=mais de 5; 8=zero)
8. Número de parceiros ao longo da vida {numparc2}  (0=1-9; 1=10-49;  
2=>50; 8=zero)
9. Manteve relação sexual com:
- a) receptor de transf. de sangue {conttrans}  (0=n; 1=s; 9=ns)
- b) usuário de drogas intravenosas {contUDIV}  (0=n; 1=s; 9=ns)
- c) profissionais do sexo {contprost} .....  (0=n; 1=s;  
9=ns)
- d) alguém que tenha tido hepatite {contheпа}..... (0=n; 1=s; 9=ns)  
Se 1, foi associado a HCV {contHCV} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)
10. Fez uso de complexos vitamínicos intravenosos  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Já compartilhou seringa {compserin1} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)
11. Fez uso de drogas ilícitas {udil} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
{qual17} | \_\_\_\_\_  
Ainda faz uso {fazudil} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Duração {tudil} .....   (anos)
12. Fez uso de drogas intravenosas {udiv} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Ainda faz uso {fazudiv} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Duração {tudiv} .....   (anos)  
Já compartilhou seringa {compserin2} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)
13. Fez uso de {coca inal}ada .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Ainda faz uso {fazcoca} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Duração {tcoca} .....   (anos)  
Já compartilhou canudinho {comptcan} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Recorda sangramento nasal {epistaxe} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)
14. Já esteve {preso} .....  (0=n; 1=s; 9=ns)  
Tempo de prisão {tprisao} .....  (0=menos de 1a;  
1=1a;2=1-2a;  
3=2-5a; 4= mais de 5a)

## Anexo II

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Em acordo com as Normas da Resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996, aprovada na 59ª Reunião Ordinária do Plenário do Conselho Nacional de Saúde)

**Instituições de pesquisa:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-HUPE/S/UFBA e Fundação Bahiana para o Desenvolvimento da Ciência (FBDC).

**Título do projeto:** Caracterização Ultra-estrutural e Molecular do Vírus da Hepatite B e C no Sangue e na Saliva.

**Pesquisador Responsável:** Dr. Mitermayer Galvão dos Reis.

Este documento procura fornecer ao (a) Sr.(Sra.) informações sobre a utilização de sua amostra de sangue e saliva para pesquisas sobre os vírus que causam a hepatite B (VHB) e C (VHC).

O (A) Sr.(Sra.) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou dela se afastar a qualquer momento, sem que venha a sofrer qualquer constrangimento ou penalidade por parte das instituições de pesquisa.

Os procedimentos e exames que serão realizados incluem: coleta de 10mL de sangue da veia que pode gerar um ligeiro desconforto devido à punção, coleta de saliva, exames moleculares para detecção e tipagem do VHB e do VHC. Os pacientes participantes receberão os resultados dos exames realizados.

Os riscos e danos da pesquisa são praticamente nulos. Este estudo contribuirá para o entendimento da transmissão do VHC e a identificação de grupos que possam ser beneficiados pelo tratamento com medicamentos.

Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em nenhuma circunstância. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Todos os dados colhidos para a avaliação clínico-epidemiológica estarão codificados no computador, sob sigilo, não permitindo sua identificação.

Declaro estar ciente do inteiro teor da investigação proposta e assino o presente Termo de Consentimento.

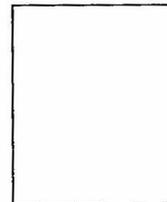
Nome do voluntário \_\_\_\_\_ Salvador-Bahia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do voluntário, pais  
ou responsáveis legais \_\_\_\_\_

Assinatura do investigador \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha \_\_\_\_\_

Contato: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Tel: (71) 3176-2265 Fax: (71) 3176-2289



Impressão digital do voluntário, pais  
ou responsáveis legais (caso necessário)

### Anexo III

Cálculo do número de equivalentes genômicos:

$$N = n/k'.k''.k'''$$

N= cálculo do número de cópias/reação esperados apartir de 200  $\mu$ L de soro.

n= número de cópias na reação de PCR em Tempo Real.

K'= 0,50, fração esperada de recuperação do RNA extraído.

K''= 1, fração do RNA extraído utilizado na reação de transcrição reversa (para formar o cDNA).

K'''= 0,28, fração do cDNA utilizada na reação de PCR em Tempo Real.