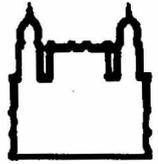




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**DETECÇÃO DO RNA DO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)
NA SALIVA DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS
PELO VHC**

LILIANE ELZE FALCÃO LINS KUSTERER

Salvador - Bahia - Brasil

2004



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-graduação em Patologia

**DETECÇÃO DO RNA DO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)
NA SALIVA DE PACIENTES CRONICAMENTE
INFECTADOS PELO VHC**

LILIANE ELZE FALCÃO LINS KUSTERER

Professor Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutora em
Patologia

Salvador-Bahia
2004

C Pq G M
Biblioteca

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /
FIOCRUZ – Salvador - Bahia

K97d Kusterer, Liliane Elze Falcão Lins

Detecção do RNA do vírus da hepatite C (VHC) na saliva de pacientes cronicamente infectados pelo VHC.

[manuscrito] / por Liliane Elze Falcão Lins Kusterer. – 2004.

91 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

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

1. Hepatite C. 2. Saliva. 3. Patologia bucal. I. Título.

CDU 616.36-002:591.131.3

10501

4(FN)3)3
001664

616.36-002:591.131.3

K97d

Deteccção do RNA do Vírus da Hepatite C (VHC) na Saliva de Pacientes Cronicamente Infectados pelo VHC e Correlações com Patologias Bucais

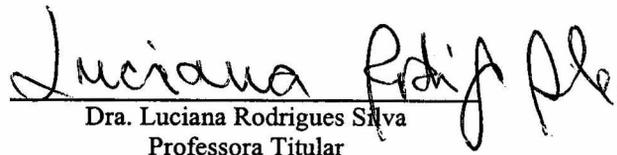
LILIANE ELZE FALCÃO LINS KUSTERER

FOLHA DE APROVAÇÃO

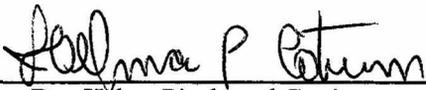
COMISSÃO EXAMINADORA



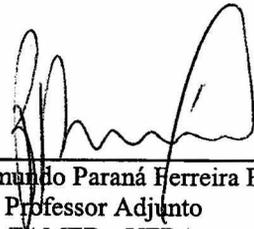
Dr. Edmar José Borges de Santana
Professor Titular
UFBA



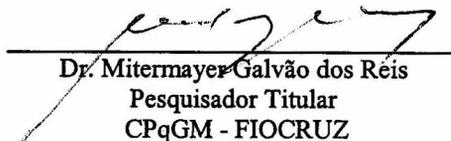
Dra. Luciana Rodrigues Silva
Professora Titular
UFBA



Dra. Helma Pinchemel Cotrim
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho
Professor Adjunto
FAMED - UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

À Deus fonte de toda sabedoria, minha fortaleza e sustento nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Isaías Andrade Lins Filho e Enilda Falcão Lins, pelo esforço e amor imensuráveis que muito contribuíram para minha formação.

Aos meus filhos queridos, Matheus Lins Rocha e David Lins Kusterer, presentes de Deus na minha vida.

Ao meu querido esposo Ronald Walter Kusterer pelo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Mitermayer Galvão dos Reis, Orientador desta Tese, exemplo de Professor e Pesquisador, que muito contribuiu na minha vida profissional.
- Ao Professor Raymundo Paraná, pessoa notável, grande exemplo de mestre que tive a oportunidade de conhecer e conviver durante a execução deste trabalho, pelo apoio constante e incentivo e por compartilhar os seus conhecimentos na área, que tanto contribuíram para realização desta pesquisa.
- Ao querido e distinto Aluno Herbert Ives Almeida pela participação ativa, seriedade e dedicação que muito contribuíram para a realização desta pesquisa.
- À Fundação Oswaldo Cruz que propiciou e apoiou esta pesquisa através de recursos.
- Ao laboratório INSERM (*Institut National de la Santé et de la Recherche Medical*) Unidade 271 Lyon/França pela análise da carga viral, especialmente ao Professor Christian Trepó.
- Aos colegas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Maria Betânia Souza da Silva e Luciano Kalabric Silva por compartilhar os conhecimentos na área de Biologia Molecular.
- Aos Professores Luiz Antônio Rodrigues de Freitas e Washington Luís Conrado dos Santos, coordenadores da Pós-graduação, e a todos os professores do curso pela disponibilidade, dedicação e competência demonstradas.

- A Ana Christina Caldeira de Campos, bibliotecária do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela normalização desta tese e revisão de referências. A Ana Maria Fiscina Sampaio, igualmente bibliotecária deste Centro, pela cooperação e dedicação ao longo do curso.
- À secretária Rosália Oliveira, pela dedicação, carinho e apoio a nós outorgados durante estes anos de estudo.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Água DEPC	Água tratada com dietil pirocarbonato
Anti-SSa/Ro	Anticorpos contra o antígeno Ro, proteína citoplasmática ligada ao RNA
Anti-SSb/La	Anticorpos contra partículas protéicas do RNA
Anti-VHC	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
<u>bDNA</u>	DNA ramificado
CDC	Centro de Controle de Doenças
cDNA	DNA complementar
CPOD	Dentes Cariados Perdidos e Obturados
DPCF	Doença Parenquimatosa Crônica do Fígado
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos
GuSCN	Tiocianato de guanidina
ICNTP	Índice Comunitário de Necessidades de Tratamento Periodontal
INSERM	Institit National de la Santé et de la Recherche Medical
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular – FIOCRUZ
pb	Pares de Bases
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RFLP	Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
RIBA	Ensaio imunoblote recombinante

RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
ppm	Rotações por minuto
Taq DNA	DNA polimerase do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
UV	Luz ultravioleta
VHC	Vírus da hepatite C
VHC-RNA	Ácido ribonucléico do vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURA

- Figura 1- Gel das amostras pareadas de soro e saliva do grupo VHC-RNA positivo. 54
- Figura 2- Gel exemplificando os diferentes genótipos. 55
- Figura 3- Gel das amostras pareadas de soro e saliva do grupo controle. 55

LISTA DE QUADROS

Quadro-1	Carga viral do VHC no soro do grupo VHC-RNA positivo. AMPLICOR MONITOR-UI	63
----------	--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Tabela com dados demográficos dos grupos VHC-RNA positivo e controle	53
Tabela 2-	Tabela com os resultados dos PCRs dos grupos VHC-RNA positivo e controle	56
Tabela 3-	Comparação de doença periodontal entre os grupos VHC-RNA positivo e controle	57
Tabela 4-	Comparação de xerostomia entre os grupos VHC-RNA positivo e controle	57
Tabela 5-	Comparação do VHS com manifestação bucal entre os grupos VHC-RNA positivo e controle	58
Tabela 6-	Distribuição dos fatores de risco para VHC nos grupos VHC-RNA positivo e controle	60
Tabela 7-	Distribuição celular dos esfregaços de saliva do grupo VHC-RNA positivo	62

RESUMO

DETECÇÃO DO RNA DO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) NA SALIVA DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELO VHC. **LILIANE ELZE FALCÃO LINS KUSTERER.** A pesquisa do vírus da hepatite C (VHC) em outros fluidos corporais que não o sangue torna-se de grande importância na avaliação das vias de transmissão não-parenterais e pode representar uma alternativa mais simples e econômica para a detecção. Pesquisas soro-epidemiológicas indicam que a saliva pode ser uma potencial via de infecção e que o risco desta tem aumentado entre cirurgiões-dentistas, embora a origem do VHC na saliva ainda não esteja bem definida. **Objetivo:** O propósito do presente estudo é verificar se a saliva pode ser utilizada como amostra para detecção e genotipagem do VHC em substituição ao soro. **Materiais e métodos:** O estudo realizado através da avaliação de amostras de 50 pacientes com infecção por VHC virgem de tratamento e de 25 pacientes com Doença Parenquimatosa Crônica do Fígado (DPCF), excluindo o VHC, atendidos no Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia da HUPES/UFBA no período de janeiro e dezembro de 2002 em Salvador, Bahia. Os seguintes dados foram coletados: idade, gênero, fatores de risco para o VHC, dados de saúde bucal e determinação da carga viral. Exames intra e extrabucais foram realizados. A presença de dentes e cáries visíveis foram registrados e o estado de saúde periodontal foi avaliado. A detecção do VHC foi analisada em relação as variáveis analíticas, clínicas e demográficas através do programa EPI-INFO 6, sendo $p < 0.05$ estatisticamente significativa. **Resultados:** O VHC foi detectado por *nested* PCR em 100% das amostras de soro e saliva. Nenhuma das amostras de saliva do grupo controle foi positivas para o RNA do VHC. Nenhuma correlação entre presença viral na saliva e doença periodontal ou outra patologia foi observada. Não houve relação de significância estatística entre a carga viral sanguínea e a detecção do VHC na saliva. Não foram observadas diferenças entre os genótipos no soro e saliva. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo sugerem que o RNA do VHC se encontra presente na saliva de pacientes infectados independente da carga viral sanguínea e patologia bucal. Estes achados sugerem que testes aplicados à saliva podem ser utilizados em pesquisas epidemiológicas de difícil coleta sanguínea e em áreas de difícil alcance.

Palavras-chave: Hepatite C. Saliva. Patologia bucal.

ABSTRACT

DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS RNA IN SALIVA FROM CHRONICALLY INFECTED PATIENTS BY HCV. **LILIANE ELZE FALCÃO LINS KUSTERER.** The search of hepatitis C virus (HCV) in body fluids other than blood is of importance to evaluate possible nonparenteral routes of transmission and can represent a simple and an economical alternative to detect the HCV. Seroepidemiological surveys indicate that saliva may be a potential source of infection and dentists are at a substantially increased risk, although the source of HCV in saliva has not been defined yet. **Objective:** The aim of this work is verify if saliva can be used as a available sample to detect and genotype the HCV, substituting serum **Materials and methods:** The study included 50 patients with HCV infection who were not undergoing anti-viral treatment and 25 patients with chronic liver diseases excluding virus C from the Gastroenterology and Hepatology Service of the HUPES/UFBA between January and December of 2002 in Salvador, Bahia. The following data were recorded: age, sex, identified risk factor for HCV, dental care data and viral load was determined. Both extra-oral and intra-oral examinations were conducted. Teeth present and visible caries were recorded and periodontal condition was measured. The presence of HCV was examined in relation to the demographical, clinical and analytical variables using EPI- INFO 6 program and significance was considered at the $p < 0.05$ level. **Results:** HCV was detected by nested PCR in 100% of the serum and saliva samples. None of the serum and saliva samples from control group was positive for HCV RNA. No correlation was found between HCV presence in saliva and periodontal disease or other oral pathology. There was no statistically significant relation between plasma viral load and saliva HCV detection. Also, there was no difference between genotype in saliva and serum. **Conclusion:** The result of this study suggests that HCV RNA is present in saliva of HCV infected patients independent of the viral load and oral pathology. These finds suggests that tests on saliva can be useful in epidemiological surveys when blood collection is hard and in populations that are difficult to reach.

Key words: Hepatitis C. Saliva. Oral pathology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<u>ASPECTOS GERAIS</u>	17
1.2	<u>MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VHC</u>	20
1.3	<u>DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C NA SALIVA POR PCR</u>	23
1.4	<u>DETECÇÃO DO VHC NA SALIVA ATRAVÉS DE ELISA</u>	32
1.5	<u>PATOLOGIAS BUCAIS CORRELACIONADAS COM O VHC</u>	34
1.6	<u>INFECÇÃO PELO VHC EM CIRURGIÕES-DENTISTAS E RISCO DE TRANSMISSÃO DURANTE TRATAMENTO DENTÁRIO</u>	37
2	OBJETIVOS	39
2.1	<u>OBJETIVO GERAL</u>	39
2.2	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	39
3	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	40
4	CASUÍSTICA, PACIENTEE MÉTODOS	41
4.1	<u>AMOSTRA</u>	41
4.2	<u>CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</u>	42
4.3	<u>CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</u>	42
4.4	<u>DESENHO DO ESTUDO</u>	43
4.5	<u>MÉTODO</u>	43
4.5.1	Coleta de dados e amostra	43
4.5.2	Extração do VHC-RNA do soro e da saliva e transcrição reversa	44

4.5.3	Detecção do VHC-RNA por <i>nested</i> PCR	47
4.5.4	Análise dos produtos de PCR	48
4.5.5	Genotipagem	48
4.5.6	Carga viral	50
4.5.7	Esfregaço de saliva	50
4.6	<u>EXAME BUCAL</u>	50
4.7	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	52
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A	81
	ANEXO B	82
	ANEXO C	83
	ANEXO D	86
	ANEXO E	88
	ANEXO F	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) representa uma das maiores causas de doença hepática crônica no mundo, sendo atualmente a maior indicação para transplante hepático. De acordo com dados da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 3% da população mundial, ou aproximadamente 170 milhões de indivíduos apresentam-se infectados por este agente infeccioso (OMS, 2002).

Os países em desenvolvimento têm apresentado as frequências mais altas de infecções. Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 1996), 2,8% das hepatites agudas no país foram atribuídas ao VHC, sendo a prevalência brasileira estimada em 1,5%. Silva et al. (1995) realizou a soroprevalência geral, em duas populações com características distintas no Estado da Bahia. Em Salvador, capital do estado, foi encontrada uma prevalência de 1,25%, enquanto em Castro Alves, zona rural, esta foi de 0%. Com relação à dos doadores de sangue em Salvador, o estudo de Santana et al. (1996) estimou uma prevalência de 1,7%, sendo que o relatório do HEMOBA (1999) demonstrou uma diminuição deste percentual para 1,5%. Recentemente, o trabalho realizado por Zarife et al.

(2002) em amostras coletadas no Estudo de para Avaliação do Impacto Sobre a Saúde do Programa de Saneamento Ambiental de Salvador e Cidades do Entorno da Baía de Todos os Santos encontrou uma prevalência de 1,5%.

A principal via de transmissão do VHC é parenteral, através de sangue contaminado, devendo quaisquer recipientes com sangue ou componentes sangüíneos ser considerados como um risco de contaminação pelo VHC. Antes da triagem sorológica com ELISA de primeira geração no início dos anos 90, o VHC foi responsável por 90% das infecções pós-transfusão de hepatite não-A e não-B (TREMOLADA et al., 1991). A contaminação com agulhas infectadas por profissionais de saúde em acidentes de trabalho tem sido relatada, e, mais recentemente, a transmissão simultânea de VHC e HIV caracterizada com a conversão tardia do soro de ambas viroses, ocasionando uma rápida e fatal progressão de doença hepática (RIDZON et al., 1997).

As vias de transmissão vertical não estão totalmente esclarecidas e 40% dos pacientes infectados apresentam fatores de riscos desconhecidos, sugerindo a possível existência de outras vias de transmissão (ALLANDER et al., 1995). O genoma viral da hepatite C já foi detectado em amostras de sêmen e secreção vaginal de pacientes infectados, e casos de transmissão sexual têm sido relatados (FIORE et

al., 1995; TANG et al., 1996). Embora haja uma menor prevalência de infecção via transmissão sexual, fatores como tempo de duração da relação, existência de doenças hepáticas e co-infecção com HIV ou outras viroses, como o herpes simples, podem contribuir para o aumento desta prevalência (KAO et al., 1996; MEISEL et al., 1995).

O RNA do VHC também já foi detectado na saliva de pacientes contaminados (COUZIGOU et al., 1993; ROY et al., 1995; WANG et al., 1991) e o estudo experimental em chimpanzés realizado por Abe e Inchauspe (1991) demonstrou a contaminação após a inoculação de saliva positiva para RNA do VHC em macacos hígidos.

A transmissão de doenças via sangüínea é um risco potencial para pacientes e equipe odontológica, especialmente Cirurgiões Buco-maxilo-facias. Estudos mais recentes relatam a possível detecção do vírus da hepatite C na saliva (CHEN et al., 1995; TANG et al., 1996) e sugerem que os procedimentos cirúrgicos sejam fatores moduladores dos níveis de concentração do VHC. Entretanto, a literatura não relata a correlação de doença periodontal, que está associada ao sangramento gengival, com o aumento das concentrações do genoma viral da hepatite C na saliva. Questiona-se então, o risco de transmissão do VHC durante tratamentos odontológicos, principalmente no caso de doença periodontal que provoca

o fácil sangramento gengival, e a terapêutica envolve o uso de instrumentos pontiagudos e cortantes para a remoção mecânica do tártaro.

1.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO VHC

Vários métodos de diagnóstico do VHC foram desenvolvidos baseados no conhecimento da estrutura viral. Dentre estes se encontram os testes de detecção de anticorpo contra proteínas virais, utilizando métodos imunoenzimáticos (EIA). O teste de primeira geração para detecção de anti-VHC foi desenvolvido por Kuo et al. (1989), incorporando o epitopo da proteína c100-3 da região não estrutural do vírus C. Este teste se tornou comercialmente disponível e largamente utilizado, causando grande impacto na triagem de doadores de sangue, diminuindo a incidência de infecções politransfusionais não-A não-B (ALTER et al., 1989). Atualmente, o teste anti-VHC de terceira geração tem sido utilizado com sensibilidade em torno de 97% e especificidade em 95% em doadores de sangue (MOYER et al., 1999).

Apesar do aumento da sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA com a incorporação de antígenos da região estrutural e não estrutural, o RIBA deve ser utilizado como exame confirmatório. Este teste baseia-se na imobilização de antígenos específicos do VHC,

recombinantes ou sintéticos, em fita de nitrocelulose (LOK; GUNARATNAM, 1997).

Com relação a detecção do VHC no soro, esta é realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde o RNA é primeiramente extraído, sendo realizada então a sua transcrição em DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa. Em seguida o cDNA é amplificado com a utilização de *primers* específicos, enzimas e variações de temperatura (SILVA et al., 2000).

A técnica de PCR permite o diagnóstico da infecção pelo vírus C, inclusive no início da infecção aguda, antes da possível detecção de anticorpos ou alterações em transaminases (HOUGHTON et al., 1991). Além de ser um teste confirmatório, deve ser solicitado nos casos de hepatite aguda ou fulminante, controle de transmissão perinatal, diagnóstico de infecção em imunossuprimidos e monitoramento de tratamento.

O PCR apresenta padronização difícil e devido a sua alta sensibilidade (100 a 500 cópias/ml), pode apresentar falsos positivos por contaminação. Ainda, devido a procedimentos inadequados no processamento das amostras e na conservação das mesmas, além da variação de método empregado, pode ocorrer falso negativo. Também a

ocorrência de falsos negativos, pode ser decorrente do período de intermitência na replicação viral (LOK; GUNARATNAM, 1997).

Com relação à quantificação viral por PCR, os testes *in house* são pouco padronizados e reprodutíveis, inviabilizando o seu uso. No mercado existem testes disponíveis comercialmente e padronizados como o *AMPLICOR HCV Monitor, Roche*. Em geral, teste baseia-se na introdução de uma seqüência sintética de VHC-RNA padrão durante a fase de amplificação. O Padrão é então amplificado juntamente com o RNA da amostra e após a desnaturação os produtos do PCR são colocados em contato com as sondas específicas para os cDNAs selvagem e padrão. Após a reação colorimétrica, os títulos das amostras testadas são comparados aos dos padrões, obtendo-se a quantificação (LOK; GUNARATNAM, 1997).

A técnica de quantificação por bDNA não amplifica a molécula a ser detectada e sim o sinal que identifica a presença desta. São utilizadas cinco sondas em fase sólida de reação para captura do RNA por hibridização. Sondas extensoras se unem a moléculas amplificadoras que por sua vez possuem a capacidade de ligação a sondas marcadas com biotina que reagem especificamente com o conjugado avidina-fosfatase alcalina. O material é então incubado com substrato luminescente que se liga a fosfatase alcalina, possibilitando medir a emissão de luz na amostra.

Gretch et al. (1995) avaliaram a eficácia do PCR quantitativo com relação ao bDNA entre quatro diferentes grupos de pacientes: doadores de sangue, pacientes com diferentes graus de infecção pelo VHC, pacientes em hemodiálise e receptores de transplante de fígado infectados pelo VHC. De acordo com os resultados, o PCR quantitativo mostrou-se extremamente mais sensível que o bDNA.

1.3 DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C NA SALIVA POR PCR

O VHC foi identificado pela primeira vez no soro de chimpanzés, inoculados com soro de pacientes infectados, por Choo et al. (1989). A partir dessa observação o VHC tem sido considerado o principal agente etiológico das hepatites virais não-A não-B pertencente à família *flaviviridae*. O método padrão ouro para o diagnóstico do vírus da Hepatite C é o RT-PCR, sendo utilizado para distinguir paciente soro-positivo com uma infecção resolvida de pacientes virêmicos, principalmente entre os que apresentam níveis normais de aminotransferases. A sua identificação na saliva foi realizada primeiramente por Takamatsu et al. (1990). Os autores analisaram cinco pacientes portadores de doença parenquimatosa crônica do fígado, dentre estas, hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular, sendo as cinco amostras positivas. Neste trabalho, os autores sugerem que a presença viral na saliva seja

decorrente de células mononucleares infectadas constituintes da saliva total.

Amostras de saliva de seis pacientes, VHC-RNA positivos no soro, que estavam em tratamento dentário, foram analisadas por Komiyama et al.(1991), juntamente com a saliva de sete pacientes em tratamento para hepatite C, inclusive fazendo uso de interferon. Nos indivíduos em tratamento dentário, a saliva foi positiva em apenas duas amostras, enquanto nos indivíduos em tratamento para hepatite C, todas as amostras apresentaram-se negativas, indicando que o uso de agentes antivirais pode diminuir a concentração viral no soro e em outros fluidos corporais.

A transmissão, através de saliva, das hepatites não-A não-B foi demonstrada experimentalmente por Abe et al. (1987) e em 1991, Abe e Inchauspe analisaram a saliva de quatro chimpanzés infectados com VHC, através de *nested* PCR, sendo a saliva de duas amostras positivas. O RNA viral também foi identificado no soro de chimpanzés previamente hígidos inoculados com saliva RNA positiva para VHC.

Embora a transmissão do VHC seja principalmente parenteral, existem evidências de contaminação através de outras vias, inclusive por meio de mordidas humanas. Um indivíduo de 59 anos residente em São Paulo, Brasil, previamente sadio, foi mordido no dedo, com produção de

sangramento, pelo seu filho VHC e HIV positivo, havendo a transmissão somente da hepatite C neste caso (FIGUEIREDO et al., 1994).

Muitos fluidos corporais têm sido estudados para maior esclarecimento de possíveis vias de transmissão associadas, sendo os achados na literatura sobre a precisão do teste para detecção do VHC-RNA na saliva bastante variáveis. Em 1991, Hsu et al. avaliaram através de *nested* PCR soro, saliva, sêmen, urina e secreção vaginal em 19 pacientes, sendo apenas as amostras de soro VHC-RNA positivas. Outro estudo similar foi realizado por Fried et al. (1992), avaliando 14 pacientes VHC-RNA positivos no soro, através de PCR, que se apresentaram negativos nas amostras colhidas de saliva e sêmen. Em contrapartida, em 1992, Nakano et al. avaliaram através de *nested* PCR 10 pacientes com doença hepática crônica com anti-VHC positivo. Todas as amostras de soro foram VHC-RNA positivas, sendo seis positivas de saliva, três de urina e duas de suor. Somando-se a estes resultados o estudo de Liou et al. (1992) identificou a presença do VHC-RNA no soro de 34 pacientes com doença hepática crônica, sendo que nas amostras de saliva a detecção foi de 48% (15/31). As amostras de ascite obtiveram maior prevalência (100%), enquanto as de sêmen e urina apresentaram 24% e 7% respectivamente.

A presença de VHC-RNA na saliva em 14 pacientes VHC positivos pós-transfusão foi avaliada, juntamente com a possibilidade de transmissão

entre cônjuges. As amostras pareadas de soro foram todas RNA positivas, enquanto as de saliva apresentaram-se positivas em apenas sete pacientes. Nenhum cônjuge de pacientes com positividade salivar apresentou resultado positivo para VHC, sugerindo um baixo risco de transmissão entre casais (WANG et al., 1992).

Para avaliação de possível transmissão vertical, estudos com gestantes VHC-RNA positivas têm sido realizados. Em 1993, Ogasawara et al. estudaram amostras de soro, saliva e leite materno de 10 pacientes VHC-RNA positivas durante o período de cinco dias após o parto. Todas as amostras de soro foram positivas, juntamente com cinco amostras de saliva. A detecção viral não foi possível nas amostras de leite materno.

Ainda em 1993, Couzigou et al. avaliaram 37 pacientes VHC-RNA positivos no soro dentre os quais 62% (23) apresentaram saliva igualmente positiva através de PCR, sugerindo a possibilidade de transmissão do VHC via saliva. Numata et al. (1993) analisaram amostras de saliva e urina de 23 pacientes VHC-RNA positivos no soro, sendo encontrado 34,8% de positividade na saliva e 56,5% na urina. Embora a saliva total seja constituída também por células mononucleares, o estudo de Young et al. (1993) não apresenta uma forte associação da positividade celular com a positividade no soro e na saliva. As amostras foram avaliadas através de nested PCR, apresentando 24% (12/50) de positividade em células

mononucleares. Dentre os pacientes RNA positivos na saliva (25), 18 foram negativos para o VHC nas células mononucleares, enquanto nos 25 pacientes RNA negativos para saliva, cinco foram positivos para o VHC em células mononucleares. Em 1994, Puchhammer-Stöckl et al. avaliaram bochechos com soro fisiológico em 35 crianças com hepatite C adquirida pós-transfusão, através de *nested* PCR, sendo o RNA viral detectado em apenas 20% das amostras.

Análises de saliva e suco gástrico também foram realizadas para detecção do RNA do VHC em 32 pacientes portadores do VHC, sendo positivo em 21 amostras das 32 de saliva e 15 das 22 de suco gástrico (KOMIYAMA et al., 1995).

Ainda em 1995, amostras pareadas de soro e saliva foram coletadas em 18 pacientes doadores de sangue anti-VHC positivos, dentre os quais foram selecionados aleatoriamente nove para tratamento com interferon durante 20 semanas, e nove para observação durante o período. Durante o seguimento do estudo até o final, somente 14 pacientes, sete tratados e sete não-tratados, completaram as etapas necessárias. As amostras de saliva dos sete pacientes apenas em observação foram todas positivas durante o estudo, sendo também positiva nas amostras de saliva dos dois pacientes que não responderam ao tratamento. Nenhuma correlação foi encontrada entre o nível do RNA do VHC no soro e o fato de positividade

para o mesmo na saliva (ROY et al. 1995). Os autores sugerem a possibilidade do monitoramento do tratamento através da avaliação salivar, no entanto, torna-se necessário maior estudo, no objetivo de melhorar a metodologia.

O tratamento dentário na Itália tem sido descrito em 9% dos casos como a única possível via de transmissão da hepatite C. Piazza et al. (1995) avaliaram a contaminação de instrumentos e superfícies após o tratamento dentário de 35 pacientes VHC-RNA positivos. Foram colhidas 328 amostras analisadas através de PCR, sendo 20 amostras consideradas positivas, dentre as quais bancadas, turbinas, sugadores, fórceps, odontoscópio e brocas.

O risco de transmissão e a detecção do VHC durante tratamento dentário também foi avaliado por Chen et al. (1995) em 26 pacientes portadores da doença antes e após cirurgia bucal. Dentre estes pacientes, 11 apresentaram-se co-infectados com HIV. Das amostras de soro, 88% (23/26) foram positivas através de nested PCR e somente 17% das de saliva apresentaram-se positivas com o mesmo teste. Os autores identificaram em uma das amostras colhidas após a intervenção cirúrgica a presença do RNA do VHC na saliva, não sendo este mesmo resultado observado 24 h após. Sugere-se que as intervenções dentárias aumentem o risco de exposição viral, contribuindo para o aumento da prevalência do

VHC entre cirurgiões-dentistas. Sugimura et al. (1995) avaliaram 76 pacientes cronicamente infectados pelo VHC em uma comunidade japonesa, correlacionando a positividade viral na saliva com a duração e a intensidade da disfunção hepática. Embora na literatura haja controvérsias a este respeito, os autores afirmam que a positividade do genoma viral na saliva foi maior nos pacientes com valores elevados de transaminases.

A recorrência de hepatite C após transplante de fígado pode estar associada com o tipo de genótipo infectante, com o polimorfismo do gene de IL-10 e com altos níveis de RNA viral no sangue o que poderia aumentar a expressão viral em fluidos corporais. Na tentativa de avaliar esta correlação, Caldwell et al. (1996) testaram 152 amostras de fluidos corporais, incluindo saliva, sêmen, secreção vaginal, urina e suor de 33 pacientes portadores de hepatite crônica por VHC. Dos pacientes estudados, 21 receberam transplante de fígado, sendo as amostras de saliva positivas em cinco pacientes do grupo pós-transplante, apresentando-se negativa no grupo controle.

A frequência do vírus C na saliva de pacientes hemofílicos foi avaliada por Roy et al. (1996). Os autores analisaram 21 hemofílicos VHC-RNA positivos, dentre os quais seis apresentaram co-infecção com HIV. Das amostras de saliva avaliadas, 10 apresentaram-se positivas, sendo que em duas os pacientes eram HIV positivos.

Amostras pareadas de soro e saliva de 33 usuários de drogas injetáveis foram avaliadas através de nested PCR para detecção do RNA do VHC e genotipagem. Os autores encontraram discordância entre os genótipos das amostras pareadas em sete pacientes. A distribuição de acordo com o estudo dos genótipos entre soro e saliva apresentou-se bastante diferenciada, sendo o genótipo 2a predominante na saliva (ROY et al., 1998).

Em 1999, Fabris et al. avaliaram a detecção do VHC na saliva e a transmissão entre casais, sendo o vírus detectado em somente um dos 13 parceiros sexuais dos pacientes com VHC positivo na saliva e em um dos 14 parceiros dos pacientes cujo vírus foi detectado somente no soro.

A presença do vírus C na saliva também foi avaliada antes e após tartarectomia por Nagao et al. (2000). Foram coletadas amostras de seis pacientes RNA positivos no soro, sendo o vírus detectável na saliva antes e após o procedimento em apenas três pacientes. No trabalho citado, pôde-se observar que não houve aumento da detecção viral na saliva colhida após a remoção de tártaro que produz sangramento bucal, embora o número da amostra tenha sido pequeno.

Savoldi et al. (2001) avaliaram através do teste *Quantiplex HCV RNA 2.0*, amostras pareadas de soro e saliva em 32 pacientes anti-VHC positivos. Todos os pacientes VHC-RNA positivos no soro também apresentaram positividade salivar e dois pacientes positivos na saliva apresentaram-se negativos no soro. A presença viral no fluido crevicular em comparação com a saliva foi analisada por Maticic et al. (2001) que avaliaram 50 pacientes virêmicos, sendo o vírus detectado em 59%(29/49) das amostras de fluido crevicular e em 35%(17/48) das amostras de saliva. Os autores sugerem que o vírus da hepatite C provavelmente desempenhe um papel importante na etiopatogenia da doença periodontal.

A presença e quantificação do vírus da hepatite C em 59 pacientes co-infectados com HIV foram avaliadas em amostras pareadas de soro e saliva por Rey et al. (2001) através de nested PCR. Nenhuma correlação entre a positividade salivar e o estado de imunidade dos pacientes, assim como a idade, foi observada. Os autores encontraram correlação entre os testes qualitativos, não ocorrendo o mesmo no processo de quantificação, pois a carga viral é bem menor na saliva.

Hermida et al. (2002) encontraram correlação entre a detecção viral na saliva e a carga viral sangüínea, após avaliarem 61 amostras salivares. Nenhuma correlação foi encontrada entre a detecção salivar e idade, gênero e alterações nas transaminases.

1.4 DETECÇÃO DO VHC NA SALIVA ATRAVÉS DE ELISA

A análise de anticorpos no soro para o VHC tem colaborado para reduzir a ocorrência de hepatite após transfusão. O uso de saliva tem sido sugerido como alternativa para testar anticorpos no caso de HIV, hepatite A, hepatite B, e mais recentemente hepatite C. Sherman et al. (1994) avaliaram a eficácia dos testes para identificação de anticorpos salivares na detecção do VHC. Amostras variadas de soro e saliva foram obtidas em 236 pacientes sendo a sensibilidade do teste salivar em 98.2% e a especificidade em 99.1%. Os autores sugerem que a coleta dos fluidos bucais pode facilitar pesquisas epidemiológicas quando na dificuldade de coleta sangüínea.

McIntyre et al. (1996) avaliaram amostras de saliva em 18 pacientes soropositivos para VHC e em 49 pacientes soronegativos, utilizando dois métodos sorológicos modificados: *VHC 3.0* e *Monolisa anti-VHC*. A sensibilidade e especificidade para o primeiro teste foram de 72% e 98% respectivamente. Com relação ao *Monolisa anti-VHC*, os resultados foram de 100% de especificidade e 100% de sensibilidade, apresentando concordância com os resultados obtidos no soro. Os autores sugerem a utilização de saliva em estudos epidemiológicos, principalmente em grupos de alto risco como usuários de drogas.

Elsana et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre saliva e urina com o objetivo de substituir a detecção do VHC no soro. As amostras foram coletadas em 141 pacientes com doença hepática, em 27 com lúpus eritematoso e em 25 com artrite reumatóide, sendo 73 pacientes com doença hepática soro-positivos para o VHC. A detecção nas amostras de saliva nestes pacientes foi de 90% enquanto que nas amostras de urina, obteve-se 49%. Ainda dentre os pacientes negativos para soro e saliva, 32% das amostras de urina apresentaram positividade. É importante ressaltar que a positividade salivar não teve correlação com o grau de evolução da doença hepática. Os pacientes com doença autoimune foram todos negativos no soro e saliva, mas obtiveram 63% de positividade nas amostras de urina. Os autores sugerem que a saliva pode substituir a análise sorológica para detecção do VHC. Ainda em 1998, Bello et al. realizaram um estudo analisando amostra de saliva em 270 pacientes, dentre estes 161 VHC positivos e 109 VHC negativos. A sensibilidade do teste foi de 94.4% e a especificidade de 99.1%, sugerindo a utilização da saliva em estudos epidemiológicos em população de difícil alcance.

O fluido crevicular tem sido sugerido como uma alternativa válida para detecção do vírus da hepatite C. O estudo de Montebugnoli e Dolci (2000) avaliou amostras de saliva total e fluido crevicular em 10 pacientes soro-

positivos sendo apenas os anticorpos detectados em 8 pacientes nas amostras de fluido crevicular.

Van Doornum et al. (2001) avaliaram dois diferentes *kits* de Elisa, o *Ortho Diagnostics Systems* e o *Sanofi Diagnostics Pasteur*, em 152 pacientes infectados com HIV e usuários de drogas. A positividade foi de 79% e 88%, respectivamente, nos 102 pacientes soro-positivos. Os autores também sugerem utilização da saliva em estudos epidemiológicos para determinação de prevalência do vírus C.

1.5 PATOLOGIAS BUCAIS CORRELACIONADAS COM O VHC

Vários estudos têm sido descritos sobre a associação de patologias bucais e a presença do VHC na saliva. Dentre as patologias bucais associadas, se encontram a sialadenite, a síndrome de Sjögren, o líquen plano, o herpes labial e até o câncer bucal (BAGÁN et al., 1998; CARROZZO et al., 1996; HADDAD et al., 1992; JORGENSEN et al., 1996; NAGAO et al., 1995).

Algumas infecções virais, tais como a do Epstein Barr e a do VHC têm sido descritas na literatura como possíveis causas de sialadenite e síndrome de Sjögren. O estudo realizado por Haddad et al. (1992) analisou histologicamente as glândulas salivares menores de 28 pacientes com

VHC e as de 20 cadáveres controle, sem positividade sorológica anterior ao óbito pelo vírus da hepatite C, para avaliar a correlação de sialadenite linfocítica crônica com a infecção pelo vírus C. Dentre os grupos avaliados, 57% do grupo VHC positivo apresentou características histológicas compatíveis com síndrome de Sjögren, ao passo que no grupo controle o resultado foi de apenas 5%. No estudo realizado por Jorgensen et al. (1996), a prevalência do VHC em pacientes portadores da síndrome de Sjögren foi de 19%. Dentre estes, 24% apresentaram maior comprometimento neurológico. Já com relação aos pacientes não infectados cronicamente pelo vírus C, somente 5% apresentaram comprometimento nervoso. Dentre os pacientes VHC positivos com a síndrome, 83% apresentaram teste positivo para o vírus C na saliva.

A literatura também relata a associação do câncer bucal com o VHC. O estudo de Nagao et al. (1995) sugere a correlação entre a prevalência do vírus da hepatite C e o câncer bucal na região Nordeste do Japão. Dentre os pacientes analisados no estudo com câncer bucal, 24% foram VHC positivos por ELISA, enquanto 10,6% do grupo controle com lesões bucais não malignas apresentaram-se também positivos. No grupo com câncer bucal, o RNA viral foi detectado por PCR em 17% dos pacientes, enquanto no grupo controle a detecção foi de 3.9%.

Ainda em 1995, o mesmo grupo de Nagao et al. (1995) avaliou a prevalência no soro das hepatites B e C em 45 pacientes com líquen plano bucal no Japão. Quatro pacientes apresentaram-se positivos para o vírus B e 27 pacientes (60%) apresentaram RNA positivo para o vírus C. Em 1996, Carrozzo et al. avaliaram 70 pacientes portadores de líquen plano bucal e 70 pacientes com ceratose bucal no nordeste da Itália. Dos pacientes com líquen, 22 eram portadores de doença hepática crônica (31.4%), sendo que 16 destes eram VHC positivos, ao passo em que no grupo controle, 9 pacientes apresentaram doença hepática crônica e somente 2 eram VHC positivos, sugerindo uma correlação entre o líquen plano e vírus C.

Em 1997, Lodi et al. realizaram um estudo na Itália, avaliando a correlação do líquen plano bucal com o genótipo viral, não encontrando associação com um genótipo em particular. Bagán et al. (1998) realizaram um estudo com 505 pacientes portadores do vírus C (grupo 1), 100 pacientes com líquen plano bucal (grupo 2) e 100 pacientes sadios (grupo 3) , onde foram avaliadas a prevalência de líquen plano (grupos 1 e 3) e hepatite C (grupos 2 e 3). A prevalência do líquen plano bucal foi de 3.36% no grupo 1 e 1% no grupo controle. A prevalência no soro da infecção da hepatite C em pacientes com líquen plano bucal apresentou-se maior do que no grupo controle, sendo os valores de 23% e 5% respectivamente.

Já o estudo realizado por Tucker e Coulson (1999) na Inglaterra, paradoxalmente não encontrou correlação entre o líquen plano bucal e o VHC em 45 pacientes portadores de líquen plano bucal e 32 pacientes VHC positivos, entretanto, já no ano de 2002, Mignogna et al. avaliaram a prevalência do VHC em 600 pacientes com líquen plano bucal, sendo esta de 27.5%. A associação das duas patologias pode ser observada particularmente no Sudeste da Europa e no Japão. Ainda assim, trata-se de um tema bastante polêmico, pois estudos realizados em outras regiões não apresentam correlação entre as mesmas.

1.6 INFECÇÃO PELO VHC EM CIRURGIÕES-DENTISTAS E RISCO DE TRANSMISSÃO NO TRATAMENTO DENTÁRIO

A contaminação com agulhas infectadas por profissionais de saúde em acidentes de trabalho não é rara, podendo ocorrer transmissão simultânea de VHC e HIV, embora esta última requeira condições mais específicas para tal (RIDZON et al., 1997; SEEFF, 1991; VAGLIA et al., 1990). Somando-se a estes estudos, observações clínicas sobre a transmissão do vírus C através de mordidas humanas, com produção de ferida, também têm sido relatadas na literatura (DUSHEIKO et al., 1990; FIGUEIREDO et al., 1994).

Segundo o trabalho desenvolvido por Herbert et al. (1992) na região metropolitana de New York, 1,75% dos dentistas estavam contaminados pelo vírus da Hepatite C, sendo a prevalência maior entre cirurgiões buco-maxilo-faciais. Também os estudos realizados por Lodi e Porter (1996) relatam que a prevalência de VHC em dentistas e auxiliares de consultório dentário tem aumentado em Londres e que outros estudos de prevalência apontam a possibilidade de mais de 4.1% dos profissionais da área de saúde estarem contaminados com o VHC. Na inexistência de uma terapia efetiva e vacinação contra a doença, existe um risco significativo dos trabalhadores da área de saúde desenvolverem doença hepática crônica. Ainda deve-se salientar que a contaminação de instrumentos e superfícies após o tratamento dentário já foi avaliada, sendo possível detectar positividade viral em bancadas, turbinas, sugadores, fórceps, odontoscópio e brocas. (PIAZZA et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar se a saliva pode ser utilizada como amostra para detecção e genotipagem do VHC em substituição ao soro em pacientes cronicamente infectados.

2.2 ESPECÍFICOS

Validar os testes de detecção e genotipagem do VHC na saliva por PCR.

Verificar se existe diferença de detecção do vírus na saliva em função do genótipo.

Estudar a possível correlação da Doença Periodontal com detecção do VHC-RNA na saliva dos pacientes portadores.

Determinar se a detecção do VHC-RNA por PCR na saliva depende da carga viral no soro.

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A saliva, além do sangue, tem sido considerada infectante, não somente em estudos experimentais, mas em relatos clínicos com transmissão viral através de mordidas. O risco de transmissão via tratamento dentário é desconhecido e existem poucos dados epidemiológicos na literatura que sugerem que a saliva seja uma das vias mais freqüentes na contração da doença, com exceção da parenteral. Os estudos publicados de detecção viral na saliva com emprego de técnicas moleculares apresentam muita variação nos resultados, provavelmente em função dos métodos de detecção molecular empregados e coleta de amostra.

Pelas razões expostas acima, a padronização e validação de técnicas moleculares para o diagnóstico do VHC na saliva poderá ser uma alternativa mais simples e econômica em relação ao uso do soro. A utilização de saliva como fonte de amostra para detecção do VHC parece ser importante para entendermos um pouco mais sobre o vírus C, suas vias de transmissão, bem como, fornecer critérios para o sistema de saúde na aplicação de recursos na prevenção da doença durante tratamento dentário, através da conscientização dos agentes de saúde.

4 CASUÍSTICA, PACIENTE E METODOS

4.1 AMOSTRA

O presente estudo descritivo controlado foi composto por amostra de conveniência procedente do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Salvador, Bahia, entre Janeiro a Dezembro de 2002. Foram então selecionados 50 pacientes VHC-RNA positivos através de RT-PCR, virgem de tratamento, com média de idade de 46 anos e 25 pacientes com doença crônica parenquimatosa do fígado (DCPF) de diversas etiologias, exceto o vírus C, compondo um grupo controle com média de idade de 38 anos. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos do CPqGM / FIOCRUZ-BA. (Anexo A)

Os pacientes responderam a um questionário previamente elaborado com informações pessoais dos pacientes e perguntas relativas a fatores associados com a possível infecção pelo VHC. (Anexo B). Nos pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão dispostos abaixo, foram realizadas coletas de amostras pareadas de sangue e saliva total após bochechos com colutório e água mineral e assim como os exames clínicos extra e intrabucal.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

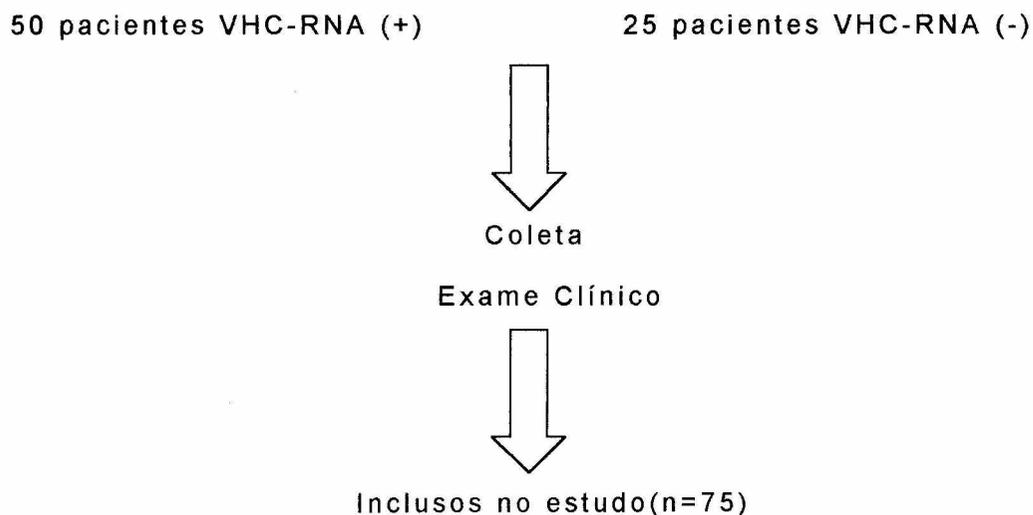
Foram inclusos no grupo VHC-RNA positivo apenas indivíduos que procuraram o HUPES-UFBA com detecção do genoma viral por PCR, sem início de tratamento com antiviral. Para o grupo controle, foram inclusos pacientes com DPCF excluindo o vírus C.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo, sem nenhum ônus para seu tratamento ambulatorial, os indivíduos que por vontade própria decidiram não participar do estudo, não realizando os exames clínicos e laboratoriais.

4.4 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo descritivo foi composto por 50 pacientes VHC-RNA positivo e 25 pacientes como grupo controle com DPCF, excluindo o VHC.



4.5 MÉTODO

4.5.1 Coleta de dados e amostra

A coleta de dados foi realizada através de entrevista e exame físico intra e extrabucal. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas em tubos de sucção a vácuo não aditivados com capacidade para 15 ml. As mesmas permaneceram por 30-60 min. no refrigerador e foram

centrifugadas por 15 min a 4°C em 2500 rpm para obtenção do soro. O soro de cada paciente foi imediatamente transferido para um tubo de congelamento de 4ml e homogeneizado. Duas alíquotas, 350 µl cada em microtubos de centrífuga, foram estocadas em *freezer* -20°C para o diagnóstico e o restante foi estocado em *freezer* a -70°C.

Foram colhidos 5ml de saliva, utilizando-se tubos não aditivados, sendo homogenizadas em Vortex durante um minuto, e logo após aliquotados 1ml em microtubos de centrífuga para serem armazenados em *freezer* -20°C para o diagnóstico.

4.5.2 Extração do VHC RNA do soro e da saliva e transcrição reversa

O VHC-RNA foi extraído das amostras do soro e saliva dos pacientes seguindo o protocolo padrão utilizado no LPBM/FIOCRUZ-BA (Anexo-C) conforme descrito anteriormente por Silva et al. (2000).

Em geral esta técnica consiste de três etapas: extração, precipitação e secagem. Durante a etapa de extração, o RNA foi separado da maioria dos contaminantes orgânicos pela extração com uma mistura desnaturante constituída de fenol, clorofórmio, GuSCN (tiocianato de guanidina):2-mercaptoetanol. Após centrifugação, o RNA permaneceu solubilizado na fase aquosa superior que foi transferida para um tubo limpo contendo

etanol e acetado de sódio. Nestas condições, o RNA foi precipitado após resfriamento à baixa temperatura e ultracentrifugação. Durante a precipitação, os contaminantes de baixo peso molecular solúveis foram eliminados, enquanto o RNA permaneceu cristalizado no fundo do tubo, sendo em seguida desidratado com etanol (95%) e seco.

Inicialmente, identificaram-se dois tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para cada amostra com a numeração na tampa dos mesmos. Foram adicionados nos primeiros tubos identificados: 355µl de solução D, 35µl de clorofórmio: al.amílico 24:1 e 200µl de amostra ou água DEPC (água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato) no caso do controle negativo. Agitou-se vigorosamente os tubos por 10" e em seguida foram centrifugados a 12.000rpm por 10' à 0°C;

Na segunda seqüência de tubos selecionados, foram adicionados 700µl de etanol P.A. (95%) e 30µl de acetato de sódio 3M pH 5,5 para, após a centrifugação dos primeiros tubos, ser feita a transferência de 300µl da fase aquosa superior. Os tubos com fenol foram descartados em local apropriado

As amostras na segunda seqüência de tubos foram homogeneizadas por 10-15" e mantidas no congelador (-20°C) por 20' para precipitação, sendo centrifugadas em seguida a 12.000rpm por 20' à 0°C.

Logo após, a fase alcóolica foi desprezada por inversão dos tubos, tomando-se cuidado para não perder o precipitado, e foram adicionados 1ml de etanol 80% em cada tubo, sendo os mesmos centrifugados a 12.000rpm por 5' à 0°C. Novamente, a fase alcóolica foi desprezada por inversão dos tubos.

Em seguida, foi adicionado 1ml de etanol P.A. em cada tubo e estes foram centrifugados a 12.000rpm por 5' à 0°C. A fase alcóolica foi então desprezada por inversão, com o mesmo cuidado das etapas anteriores.

Uma superfície do fluxo laminar foi forrada com papel toalha e os tubos foram emborcados sobre esta superfície por 15' para secar. A fim de evitar a degradação do material, foi realizada imediatamente a transcrição reversa. Na mesma, utilizou-se 14,75µl de H₂O DEPC, 5µl de tampão 5X, 2µl de DTT 0,1M, 1µl de dNTPs 10mM, 1µl de *random primer* 50µM, 0,25µl de inibidor de RNase 10U/µl e 1µl de MMLV 200U/µl para cada tubo a temperatura de 37°C por 1h e 30min. Logo após, foi realizada a desnaturação da enzima transcriptase reversa com o aquecimento a 95°C por 10'.

4.5.3 Detecção do VHC RNA por *nested* PCR

Foi realizada através de técnica *nested* PCR para a detecção do RNA do VHC em soro e saliva conforme protocolo utilizado no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular CPqGM/FIOCRUZ (Anexo D), previamente descrito por Davidson et al. (1995).

Primers específicos para a região 5'NCR foram utilizados nas reações de PCR. Na primeira reação foram utilizados 16.8µl de H₂O Mill-Q, 2,5µl de tampão 10X sem magnésio, 0,8µl de MgCl₂ 50mM, 0,1µl de dNTP 10mM, 0,3µl dos primers específicos 939s 50pmoles/µl e 209as 50 pmoles/µl e 0,2µl de taq DNA 5U/µl, num total de 21 µl para cada 4µl de cDNA. A reação foi realizada conforme o seguinte programa de temperatura: 94°C por 3'. 25 ciclos de: 94°C 25'', 50°C 35'', 68°C 2,5', 68°C 10' e 4°C.

Na segunda reação foram utilizados 79µl de H₂O Mill-Q, tampão 10X sem magnésio, MgCl₂ 50mM, dNTPs 10 mM, e os primers específicos 940s 50 pmoles/µl e 211as 50 pmoles e taq DNA, num total de 95µl para cada 5µl de produto do primeiro PCR. Após o termino da reação, os produtos foram mantidos a 4°C até a análise em gel de agarose.

4.5.4 Análise dos produtos do PCR

Os produtos dos PCR foram analisados contra luz ultravioleta (UV) após migração em gel de agarose 2% e coloração com brometo de etídio (20). Os resultados positivos apresentaram bandas com 306 e 251 pares de base (bp).

4.5.5 Genotipagem

A genotipagem foi realizada, utilizando-se o método de Lerat et al. (1998) (Anexo E). Após a detecção, os cDNAs das amostras positivas foram selecionados e submetido a reação de *nested* PCR para identificação dos genótipos. No primeiro PCR foram utilizados 35,3µl de H₂O DEPC, 5µl de tampão 10X, 1,5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de dNTPs 10mM, 1µl dos primers específicos 256 50 pmoles/µl e 186 NTER 50 pmoles/µl e 0,2µl de Taq DNA 5 U/µl para cada 5µl de cDNA. A reação foi submetida ao seguinte programa de temperatura: 94°C por 5'. 30 ciclos de: 94°C 1', 55°C 1,5', 72°C 2', 72°C 10' e 4°C.

No segundo PCR, foram utilizados 35,3 μ l de H₂O DEPC, 5 μ l de tampão 10X, 1,5 μ l de MgCl₂ 50mM, 1 μ l de dNTPs 10mM, 1 μ l dos primers específicos Mix 104 50 pmoles/ μ l (104, 104 IIa, 104 IIIa e 104 IVa) e Mix outros 50 pmoles/ μ l (132 Nbis, 133 Nbis, 134 Nbis1, 134 Nbis2, 339 Nbis e 465) e 0,2 μ l de Taq DNA 5U/ μ l para cada 5 μ l do produto do primeiro PCR. A reação foi submetida ao seguinte programa de temperatura: 94°C por 5'. 35 ciclos de: 94°C 1', 63°C 1', 72°C 1,5', 72°C 10' e 4°C. Os produtos internos para identificação dos genótipos foram 125pb para 1a, 141pb para 1b, 75pb para 2, 87pb para 3a e 336pb para 4a. Os tamanhos dos produtos da PCR foram estimados por comparação de mobilidade com o marcador de pares de base ϕ X174 RF DNA/Hae III *Fragments* (Life Technologies).

Em seguida, foram preparados géis com 100ml de agarose *Metaphor* a 4% em TAE 1X. A agarose foi transferida para um molde com dois pentes e montado na cuba de eletroforese, contendo TAE 1X. Foram misturados 5 μ l do tampão de carregamento a 25 μ l de cada amostra e analisados contra luz ultravioleta (UV) após migração em gel.

4.5.6 Carga viral

As amostras de soro do grupo VHC-RNA positivos foram avaliadas quantitativamente pelo Laboratório INSERM (*Institut National de la Santé et de la Recherche Médical*) Unidade 271 Lyon/França, utilizando o método APLICOR MONITOR-2.0 conforme instruções do fabricante (*Roche*).

4.5.7 Esfregaço de saliva

Após a estocagem das amostras de saliva, foram preparados ainda esfregaços das mesmas, centrifugando 1ml por 3' a 5000 rpm e desprezando o sobrenadante para obtenção de um concentrado maior de células. Com uma pipeta de 1000 μ L foi coletado o precipitado de saliva e gotejado sobre uma lâmina de vidro, fazendo-se o esfregaço com a mesma metodologia empregada para as amostras de sangue coradas com Wright (Anexo F).

4.6 EXAME BUCAL

Após a coleta das amostras, foram realizados os exames extra e intrabucais. A mucosa bucal e os dentes foram examinados, avaliando possíveis lesões, doença periodontal e carie. O índice CPOD, baseado no registro de dentes cariados, perdidos e obturados foi utilizado, assim com o Índice Comunitário de Necessidade de Tratamento Periodontal (ICNTP).

Os princípios do ICNTP podem ser assim resumidos:

- a) dentição dividida em seis partes;
- b) sondagem realizada em dentes índices;
- c) registros das condições periodontais através de códigos;
- d) as necessidades de tratamento são baseadas em código.

A metodologia do ICNTP foi baseada em procedimentos de sondagem, a qual propôs a detecção do sangramento gengival, de cálculo subgengival e de bolsas periodontais (PAPANOU; LINDHE, 1999). O índice utilizou sextantes como unidades básicas de exames e registro das necessidades de tratamento. O sextante teve que ter ao menos dois dentes em função para poder ser incluído no registro, sendo feito apenas um registro em cada dente. Somente foi registrado por sextante o código do número mais alto, sendo o indivíduo examinado classificado quanto às medidas terapêuticas a serem adotadas de acordo com a descrição do código abaixo.

0=Nenhum sinal de doença e nenhum tratamento;

1=Sangramento gengival após sondagem suave, necessidade de acentuar cuidados com higiene oral;

2=Cálculo supra e/ou subgengival, necessidade de acentuar cuidados com higiene oral e raspagem;

3=Bolsa de 4-5mm, necessidade de acentuar cuidados com higiene oral e raspagem;

4= Bolsa de 6mm ou maior, necessidade de acentuar cuidados com higiene oral, raspagem e tratamento completo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados coletados no estudo foi realizada com o uso do EPI-INFO 6.4d (CDC, Atlanta, EUA), usando métodos não paramétricos de Chi-quadrado, Chi-quadrado corrigido por Yates, ou exato de Fisher, para o cálculo de proporções quando recomendado, e Kruskal-Wallis H para as análises de médias. A probabilidade de erro foi considerada significativa se $p \leq 0.05$ e intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

A tabela abaixo apresenta características das amostras que constituíram os grupos VHC-RNA positivo e controle com média de idade de 46 e 38 anos, respectivamente.

Tabela 1- Dados demográficos dos grupos VHC-RNA positivo e controle.

CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA	VHC-RNA+ %	CONTROLE %
GÊNERO MASCULINO	76	76
FEMININO	24	24
1 ^o GRAU	16	28
2 ^o GRAU	58	64
3 ^o GRAU	26	8

No presente estudo, as amostras pareadas coletadas de soro e saliva dos 50 pacientes VHC-RNA positivos selecionados foram positivas em todos os indivíduos analisados (Figura 1). Dentre estes, 64% eram pertencentes ao genótipo 1, 34% ao genótipo 3 e 2% aos genótipos 1 e 3 (Figura 2). Com relação ao grupo controle, todos os indivíduos com doença crônica parenquimatosa do fígado, excluindo

a hepatite por vírus C, foram VHC-RNA negativos no soro e saliva (Figura 3). O método padronizado empregado pelo Laboratório de Patologia e Biologia Molecular CPqGM/FIOCRUZ-BA apresentou 100% de especificidade e 100% de sensibilidade conforme observado na tabela 2.

1-H₂O
 2-4-6-8-10-12-14 - Soro
 3-5-7-9-11-13-15 - Saliva
 16 - Controle Positivo Soro

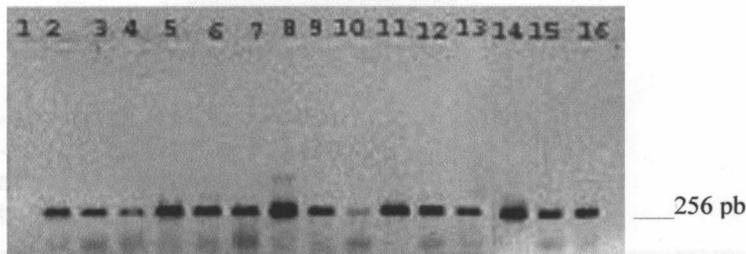


Figura 1- Amostras pareadas de soro e saliva do grupo VHC-RNA positivo em gel de agarose. A primeira amostra representa o controle negativo com H₂O DPC e a ultima o controle positivo no soro.

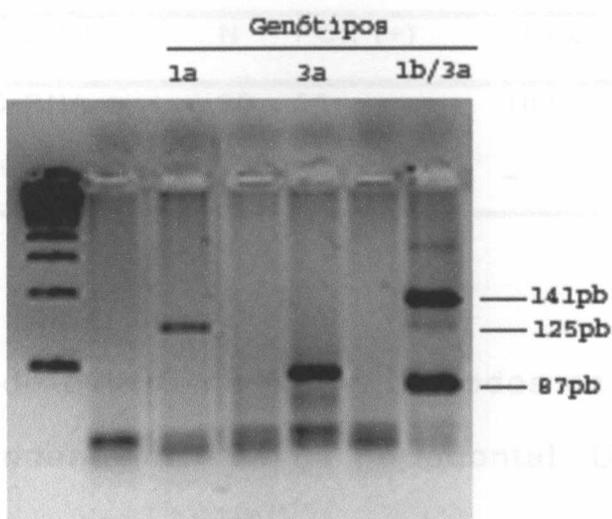


Figura 2- Gel de Metaphor exemplificando os diferentes genótipos identificados no estudo pelo método de LERAT *et al.* (1998).

1-H₂O
 2-4-6-8-10-12-14-16-18 - Soro
 3-5-7-9-11-13-15-17-19 - Saliva
 20 - Controle Positivo Soro
 21 - Controle Positivo Saliva

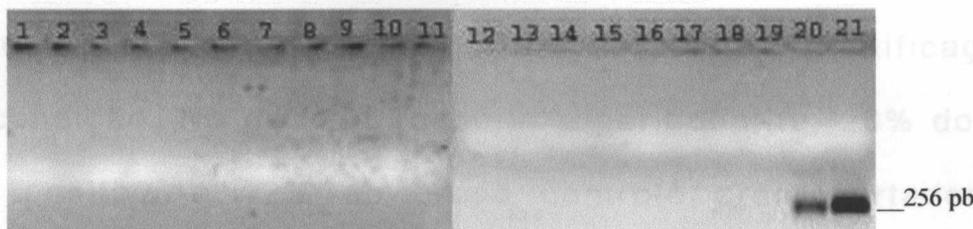


Figura 3- Amostras pareadas de soro e saliva do grupo controle em gel de agarose. A primeira representa o controle negativo com H₂O DPC e as antepenúltima e última representam os controles positivos de soro e saliva.

Tabela 2- Resultados dos PCRs dos grupos VHC-RNA positivo e controle (100% de especificidade e sensibilidade).

AMOSTRA	N	PCR (+)	FREQ%
VHC-RNA +	50	50	100
CONTROLE	25	-	-

Foi observado o VHC na saliva de todos os pacientes positivos no soro, independente de doença periodontal. Dos 50 pacientes do grupo VHC-RNA positivo, 52% apresentaram gengivite enquanto 80% do grupo controle eram igualmente portadores da doença ($p= 0.03$). Ainda, dentre os indivíduos VHC positivos, dois eram desdentados totais e não apresentaram lesões de mucosa, mas ambos apresentaram positividade viral na saliva através de *nested* PCR. A gengivite pode apresentar reversibilidade com boa higiene bucal e a periodontite necessita de intervenção do cirurgião-dentista para remoção de tártaro, representando um estado de cronificação da primeira condição. No que diz respeito a periodontite, 20% do grupo VHC-RNA positivo e 12% do grupo controle eram portadores da doença ($p= 0.3$)(Tabela 3).

Tabela 3- Comparação de doença periodontal entre os grupos VHC-RNA positivo e controle.

AMOSTRA	N	GENGIVITE	FREQ	PERIODONTITE	FREQ %
		p=0.03(Yates)	%	P=0.3(Fisher)	
VHC-RNA +	50	26	52	10	20
CONTROLE	25	20	80	3	12

No que diz respeito à função glandular na produção de saliva, 32% dos indivíduos do grupo VHC-RNA positivo apresentaram xerostomia, enquanto no grupo controle, 40% apresentou sintomas de diminuição do fluxo salivar, não havendo correlação entre diminuição funcional de glândulas salivares com a ausência ou presença do vírus C na saliva (p=0.6)(Tabela. 4).

Tabela 4- Comparação da diminuição do fluxo salivar entre os grupos VHC-RNA positivo e controle.

AMOSTRA	N	XEROSTOMIA	FREQ %
		P=0.6(Yates)	
VHC-RNA +	50	16	32
CONTROLE	25	10	40

Tanto no grupo VHC-RNA positivo, quanto no grupo controle não foram observados casos de sialadenite ou síndrome de Sjögren. Já no que diz respeito às patologias glandulares de retenção de muco em glândulas salivares menores, houve um caso no grupo VHC-RNA positivo de sialolitíase (2%) e outro de rânula (2%) ($p=0.6$).

No que diz respeito às patologias virais com manifestações bucais, 18% dos pacientes no grupo experimental apresentaram herpes labial, enquanto 20% do grupo controle eram igualmente portadores da doença. Dos cinco casos positivos no grupo controle para Herpes labial e, negativos para VHC, todos eram portadores do vírus B ($p=0.76$)(Tabela 5).

Tabela 5- Comparação do VHS com manifestação bucal entre os grupos VHC-RNA positivo e controle.

AMOSTRA	N	VHS BUCAL	FREQ%
$P=0.76$			
VHC-RNA +	50	9	18
CONTROLE	25	5	20

Em se tratando de lesão de mucosa bucal, 4% do grupo VHC-RNA positivo apresentou aftas, enquanto 12% do grupo controle também apresentou lesões isoladas ou múltiplas de aftas. Houve um caso no grupo controle (4%) de hiperplasia gengival de palato, cinco casos de hiperkeratose no grupo VHC-RNA positivo, representando 10% e dois casos no grupo controle representando 8%.

Com relação à avaliação dos fatores de risco para infecção com VHC, os dados do presente trabalho podem ser observados na tabela abaixo, havendo significância estatística na prática de sexo anal, no uso de drogas e de seringas não descartáveis.

Tabela 6- Distribuição dos fatores de risco para VHC nos grupos VHC-RNA positivo e controle.

FATORES DE RISCO VHC	VHC-RNA +		Controle	
	N=50	FREQ %	N=25	FREQ %
Experiência Homossexual	5	10	2	8
p=0.57(Fisher)				
Sexo Anal	31	62	7	28
p=0.01				
Drogas	15	30	2	8
P=0.03				
Acupuntura	2	4	0	0
P=0.4(Fisher)				
Hemotransfundidos	7	14	4	16
P=0.5(Fisher)				
Seringa não Descartável	21	42	4	16
P=0.04				
Tatuagem	6	12	3	12
P=0.65(Fisher)				
Piercing	0	-	1	4%
P=0.33(Fisher)				

Com relação a outras doenças associadas, nove pacientes do grupo VHC-RNA positivo (18%) e quatro pacientes do grupo controle (16%) relataram ter tido episódios de rinite e sinusite na historia

pregressa. Um paciente do grupo VHC-RNA positivo (2%) era HIV positivo e cinco relataram terem tido sífilis. Ainda no grupo VHC positivo, seis pacientes eram diabéticos e dois eram portadores de doença renal crônica.

Para avaliar se houve sangramento por lesões não perceptíveis a olho nu, foi pesquisada a população de células na saliva de cada paciente. Com relação ao número de células epiteliais, linfócitos e hemácias presentes nos esfregaços do grupo VHC positivo, a distribuição pode ser analisada na tabela abaixo, notando-se ausência de hemácias e predominância de células epiteliais em todas amostras. Dentre os 29 pacientes que apresentaram somente células epiteliais, dois eram desdentados totais e não apresentaram lesão de mucosa.

Tabela 7- Distribuição celular dos esfregaços de saliva do grupo VHC-RNA positivo.

Exp	N	N Células	N
N=50	Linfócitos	Epiteliais	Hemacias
1	3	97	0
8	2	98	0
12	1	99	0
29	–	100	0

No que diz respeito à carga viral pode-se observar no quadro abaixo que, independente dos valores altos e baixos encontrados, o vírus foi detectado na saliva de todos os pacientes do grupo VHC-RNA positivo.

Quadro 1- Carga viral do VHC no soro do grupo VHC-RNA positivo. AMPLICOR MONITOR-UI

N	PACIENTE	C VIRAL	N	PACIENTE	C VIRAL
1	MJC	>850.000	26	MMR	>850.000
2	ASM	300.000	27	AFA	14.500
3	CSV	>850.000	28	RCVCC	>850.000
4	JCS	72.000	29	RVBS	200.000
5	AFF	150.000	30	ELS	340.000
6	CACF	>850.000	31	ACF	370.000
7	GAD	>850.000	32	JCCCJ	19.200
8	ICRM	10.525	33	MAS	>850.000
9	EJS	111.000	34	RCG	>850.000
10	JRB	253.000	35	HCC	>850.000
11	MAMS	440.000	36	HREJ	320.000
12	JRSF	>850.000	37	ALBD	440.000
13	NSP	>850.000	38	KAF	610.000
14	BBS	>850.000	39	TMPMM	480.000
15	ABM	130.000	40	EMS	32.000
16	JSS	55.000	41	MACGL	144.000
17	JFB	11.500	42	JARC	220.000
18	NAN	720.000	43	JSBS	550.000
19	RBS	700.000	44	GPT	210.000
20	JTAF	18.000	45	GSM	>850.000
21	MSS	11.800	46	RCAM	44.000
22	VVA	530.000	47	EMS	770.000
23	LCAF	640.000	48	MJDS	88.000
24	CRCP	111.000	49	EMS	170.000
25	MFM	516.000	50	PSJ	>850.000

6 DISCUSSÃO

A saliva analisada no presente trabalho foi saliva total que é composta pelo produto secretado pelas glândulas salivares maiores e menores, juntamente com o fluido crevicular, microorganismos, células epiteliais, linfócitos e polimorfonucleares. A saliva é composta por 90% de água e os 10% restantes são compostos de amilase, enzimas lipolíticas, tiocianato, iodina e IgA. No seu conteúdo celular predominam as células epiteliais, podendo haver um número de leucócitos mais expressivo em caso de infecções bucais, embora este ainda seja bem menor com relação às células epiteliais (AVERY, 1994).

A variação de detecção do VHC na saliva nos estudos publicados na literatura é grande. Os estudos apresentam não só diferença no tipo de técnica de biologia molecular empregada para extração e detecção do vírus C, mas também na amostra, especificamente no processamento da saliva. Embora grande parte dos grupos VHC-RNA e controle tenham apresentado doença periodontal, no esfregaço realizado com a saliva o número de linfócitos não foi expressivo e não foi detectada a presença de hemácias. Nos casos de desdentados totais do grupo portador do vírus C, sem lesão de mucosa, pode-se observar apenas células epiteliais e bactérias nos esfregaços.

Ainda, estes pacientes apresentaram PCR positivo na saliva para o RNA viral da hepatite C. Estes achados estão de acordo com o estudo de Young et al. (1993) que avaliaram a positividade viral em células mononucleares, não havendo correlação com a positividade no soro. Vale salientar que o VHC foi identificado em glândulas salivares maiores e menores, inclusive através de PCR *in situ* e imunohistoquímica, podendo a positividade salivar encontrada no estudo estar relacionada com a presença viral na glândula (ARRIETA et al., 2001; BIASI et al., 1995).

No grupo portador do vírus C, utilizamos como um dos critérios de exclusão o tratamento com interferon, visto que os níveis de concentração viral na saliva são menores que no soro e o tratamento pode interferir nos resultados como foi observado no estudo de Komiyama et al. (1991). O teste de diagnóstico da presente pesquisa tem importância em estudos epidemiológicos em regiões de difícil coleta, visando à diminuição de custos e ainda abre novos horizontes para novas pesquisas, inclusive sobre a possibilidade de monitorar tratamento com antiviral.

Embora o vírus esteja presente na saliva, a transmissão entre cônjuges é de muito baixo risco (FABRIS et al., 1999; WANG et al, 1992). Existem relatos na literatura de transmissão

do VHC em casos de mordidas humanas com sangramento do indivíduo agredido (DUSHEIKO et al., 1990; FIGUEIREDO et al., 1994), embora o vírus do VHC não tenha sido seqüenciado nestes trabalhos, o que representa uma limitação na conclusão dos mesmos. É muito provável que a transmissão do VHC por esta via dependa de outros fatores, como lesões de mucosa bucal em indivíduos sadios. Já com relação ao tratamento dentário, torna-se difícil avaliar o nível de transmissão, que depende ainda da observância rigorosa das medidas de biossegurança no consultório dentário, visto que o RNA do VHC pode ser detectado em instrumentais e equipamentos dentários após tratamento dentário de indivíduos infectados, e que estudos italianos relatam que em 9% dos casos de hepatite aguda pelo vírus C o único fator de risco relatado nos últimos seis meses seria tratamento dentário (PIAZZA et al, 1995).

Apesar do estudo de Roy et al. (1998) ter observado diferença entre alguns genótipos das amostras pareadas de soro e saliva com predominância de genótipo 2a, no presente estudo não observamos diferenças entre os mesmos nas amostras de saliva e soro. O trabalho citado avaliou 50 pacientes usuários de drogas, dentre os quais somente 66% das amostras anti-VHC positivas foram positivas por PCR. Dentre estas, somente em

57.6% foram positivas em saliva. Ainda, alguns genótipos foram indetectáveis no soro, detectáveis na saliva e vice-versa.

O estudo de Matitic et al. (2001) avaliou a detecção do VHC no fluido crevicular (59%) e na saliva (37%) em pacientes VHC positivos, sugerindo que a presença viral no fluido possa ter um significativo papel na etiologia da doença periodontal. O presente estudo não encontrou associação entre doença periodontal e a presença do VHC na saliva. Ainda o fluido crevicular deve ser considerado como elemento constituinte da saliva total, tornando os dados do estudo citado inconsistentes.

De acordo com a literatura, algumas patologias bucais têm sido associadas com VHC na saliva. Dentre estas, algumas específicas de glândulas salivares, como a sialadenite e a síndrome de Sjögren (HADDAD et al., 1992; JORGENSEN et al., 1996). No presente estudo não foram observados casos das patologias citadas acima e somente dois casos de retenção de muco foram observados, um de sialolitíase e outro de rânula, ambos no grupo portador do vírus C. Entretanto, no que diz respeito a xerostomia, não houve associação deste achado clínico com o vírus C particularmente, sendo sua maior frequência no grupo controle. É importante salientar que a síndrome de Sjögren associada ao VHC geralmente apresenta resultados negativos para os anticorpos anti-SSa/Ro e anti-SSb/La.

Sendo assim, a doença em questão seria denominada de forma mais coerente como sialadenite linfocítica associada ao VHC. Ainda, a presença do vírus em glândulas salivares pode não estar diretamente relacionada à lesão tecidual glandular e sim à um processo imunológico induzido pelo vírus como pode ser observado em outras patologias de autoimunidade associadas ao vírus C, dentre as quais a tireoidite de Hashimoto, a glomeronefrite, as púrpuras vasculares e o líquen plano (WATTIAUX, 1997).

Embora o líquen plano seja outra patologia cuja literatura relata associação (CARROZZO et al., 1996; NAGAO et al., 1995), no presente estudo não houve pacientes com manifestações bucais e dermatológicas da mesma, sendo o vírus detectável, mesmo em pacientes com mucosa saudável e sem doença periodontal. Em contrapartida, o estudo realizado por Tucker e Coulson (1999) na Inglaterra não encontrou correlação entre o líquen plano bucal e o VHC, sendo a correlação das duas patologias observada particularmente no Sudeste da Europa e no Japão.

No presente estudo, a prevalência do RNA do VHC na saliva foi de 100%, divergindo da maioria dos trabalhos publicados na literatura, que apresentam uma grande variabilidade na detecção salivar. A metodologia empregada, a conservação e coleta das amostras devem ser os principais responsáveis por esta grande

variação de detecção. O uso de colutório bucal, freqüente em consultórios odontológicos, não influenciou na detecção viral.

Nesta pesquisa, utilizamos saliva total para aumentar as chances de detecção, embora o estudo de Maticic et al. (2001) tenha encontrado uma maior prevalência do RNA viral em fluidos creviculares em relação à saliva. O fluido crevicular também faz parte da saliva total, assim como células epiteliais e do sangue presente em pacientes com doença periodontal intensa. Por esta razão, a análise de elementos isolados da saliva total reduziria a possibilidade de detecção.

Embora o estudo de Hermida et al. (2002) tenha achado correlação da positividade viral na saliva com a carga viral sanguínea, na presente pesquisa não foi observada nenhuma correlação, havendo detecção salivar em cargas virais variando entre 10.525 UI a > 850.000 UI pelo método *AMPLICOR MONITOR 2.0-Roche*.

Embora uma grande percentagem de pacientes esteve exposta a algum fator de risco, ainda assim 38% não relataram fator de risco associado à infecção pelo VHC, e somente a prática de sexo anal, uso de drogas e de seringa não descartável foram relevantes com relação ao vírus C. A positividade do VHC na saliva destes pacientes

serve de alerta aos serviços públicos de saúde na área de odontologia que fazem ainda somente a desinfecção das turbinas e micro-motores utilizados no tratamento dentário. Estes achados advertem também sobre a possibilidade de contaminação durante tratamento dentário, devendo a técnica de esterilização dos materiais ser rigorosamente observada.

Estes dados demonstram que a saliva pode ser utilizada como amostra para detecção e genotipagem do VHC e servem de alerta, especificamente para os profissionais de odontologia, para que possam contribuir para minimizar a possibilidade de transmissão viral durante tratamento dentário, seja de paciente para profissional ou de profissional para paciente, através de medidas preventivas. Não somente os instrumentais de uso clínico, mas as turbinas e micromotores devem ser obrigatoriamente autoclavados como medida de biossegurança.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o RNA do VHC se encontra presente na saliva de pacientes infectados independente da carga viral sanguínea e patologia bucal e que o exame de saliva para detecção do vírus C pelo método empregado pode ser aplicado como alternativa em estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

ABE, K.; INCHAUSPE, G. Transmission of hepatitis C by saliva. **Lancet**, **337**:248, 1991.

ABE, K.; KURATA, T.; SHIKATA, T.; SUGITANI, M.; ODA, T. Experimental transmission of non-A non-B hepatitis by saliva. **J. Infect. Dis.**, **155**:1078-1079, 1987.

ALLANDER, T.; GRUBER, A.; NAGHAVI, M.; Frequent patient-to-patient transmission of hepatitis C virus in a hematology ward. **Lancet**, **345**:603-607, 1995.

ALTER, H. J.; PURCELL, R. H.; SHIH, J. W.; MELPOLDER, J. C.; HOUGHTON, M.; CHOO, Q. L.; KUO, G. 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.**, **30**:1494-500, 1989.

ARRIETA, J. J.; RODRIGUEZ-INIGO, E.; ORTIZ-MOVILLA, N.; BARTOLOME, J.; PARDO, M.; MANZARBEITIA, F.; OLIVA, H.; MACIAS, D. M.; CARRENO, V. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. **Am. J. Pathol.**, **158**:259-264, 2001.

AVERY, J. K.; Histology of saliva, pellicle, plaque, and calculus. In: AVERY, J. K. **Oral development and histology**. 2. ed. New York: Thieme Medical, 1994. cap 22, p.382-393.

BAGAN, J. V.; RAMON, C.; GONZALEZ, L.; DIAGO, M.; MILIAN, M. A.; CORS, R.; LLORIA, E.; CARDONA, F.; JIMENEZ, Y. Preliminary investigation of the association of oral lichen planus and hepatitis C. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, **85**:532-536, 1998.

BELLO, P. Y.; PASQUIER, C.; GOURNEY, P.; PUEL, J. IZOPET, J. Assessment of a hepatitis C virus antibody assay in saliva for epidemiological studies. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **17**:570-572, 1998.

BIASI, D.; COLOMBARI, R.; ACHILLE, A.; CARLETTO, A.; CARAMASHI, P.; CORROCHER, R.; BAMBARA, L. M. HCV RNA detection in parotid gland biopsy in a patient with chronic hepatitis C virus liver disease. **Acta Gastroenterol. Belg.**, **58**:465-469, 1995.

CALDWELL, S. H.; SUE, M.; BOWDEN, J. H.; DICKSON, R. C.; DRISCOLL, C. J.; YEATON, P.; STEVENSON, W. C.; ISHITANI, M. B.; MCCULLOUGH, C. S.; PRUETT, T. L.; LOVELL, M. A. Hepatitis C virus in body fluids after liver transplantation, **Liver Transpl. Surg.**, **2**:124-129, 1996.

CARROZZO, M.; GANDOLFO, S.; CARBONE, M.; COLOMBATTO, P.; BROCCOLETTI, R.; GARZINO-DEMO, P.; GHISETTI, V. Hepatitis C virus infection in Italian patients with oral lichen planus: a prospective case-control study. **J. Oral Pathol. Med.**, **25**:527-533, 1996.

CHEN, M.; YUN, Z. B.; SAILBERG, M. Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. **J. Med. Virol.**, **45**:223-226, 1995.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; MEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. **Science**, **244**:359-362, 1989.

COUZIGOU P, RICHARD L, DUMAS F, SCHOULER L, FLEURY H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. **Gut**, **34**:S59-S60, 1993.

DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P.; FERGUSON, J. C.; JARVIS, L. M.; DOW, B.C.; FOLLETT, E. A.; SEED, C. R.; KRUSIUS, T.; LIN, C.; MEDGYESI, G. A.; 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.**, **76**:1197-1204, 1995.

DUSHEIKO G M, SMITH M, SCHEUER P J. Hepatitis C virus transmitted by human bite. **Lancet**, **336**:503-504, 1990.

ELSANA, S.; SIKULER, E.; YAARI, A.; SHEMER-AVNI, Y.; ABU-SHAKRA, M.; BUSKILA, D.; KATZMAN, P.; NAGGAN, L.; MARGALITH, M. HCV Antibodies in saliva and urine. **J. Med. Virol.**, **55**:24-27, 1998.

FABRIS, P.; INFANTOLINO, D.; BIASIN, M. R.; MARCHELLE, G.; VENZA, E.; BENEDETTI, P.; TOSITTI, G.; MANFRIN, V.; De LALLA, F. 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**, **27**:86-91, 1999.

FIGUEIREDO, J. F.; BORGES, A. S.; MARTINEZ, R. et al. Transmission of hepatitis C vírus but not human immunodeficiency vírus type1 by human bite. **Clin. Infect. Dis.**, **19**:546-547, 1994.

FIORE, R. J.; POTENZA, D.; MONNO, L. Detection of HCV RNA in serum and seminal fluid from HIV-1 co-infected intravenous drug addicts. **J. Med. Virol.**, **46**:364-367, 1995.

FRIED, M. W.; SHINDO, M.; FONG, T. L.; FOX, P. C.; HOOFNAGLE, J. H.; DI BISCEGLIE, A. M. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, **102**:1426-1429, 1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis. Disponível em: <www.funsa.gov.br/epidemiologia/doencas_transmissiveis.htm>. Acesso em: 11 out.2003.

GRETCH, D.R.; DELA ROSA, C.; CARITHERS, R. L. J. R.; WILLSON, R. A.; WILLIAMS, B.; COREY, L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. **Ann. Intern. Med.**, **123**:321-9, 1995.

HERMIDA, M.; FERREIRO, M. C.; BARRAL, S.; LAREDO, R.; CASTRO, A.; DIZ DIOS, P. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. **J. Virol. Methods**, **101**:29-35, 2002.

HADDAD, J.; DENY, P.; MUNZ-GOTHEIL, C. Lymphocytic sialadenitis of Sjogren's Syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. **Lancet**, **339**:321-323, 1992.

HERBERT, A. M.; WALKER, D. M.; DAVIES, K. J.; BAGG, J. Occupationally acquired hepatitis C virus infection. **Lancet**, **339**:305, 1992.

HOUGHTON, M. ; WEINER, A.; HAN, J.; KUO, G.; CHOO, Q. L. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology** , **14**:381-8, 1991.

HSU, H. H.; WRIGHT, T. L.; LUBA, D. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reation. **Hepatology**, **14**:763-767, 1991.

JORGENSEN, C.; LEGOUFFE, M. C.; PERNEY, P.; COSTE, J.; TISSOT, B.; SEGARRA, C.; BOLOGNA, C.; BOURRAT, L.; COMBE, B.; BLANC, F.; SANY, J. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. **Arthritis. Rheum.**, **39**:1166-1171, 1996.

KAO, J. H.; HWANG, Y. T.; CHEN, P. J. Transmission of hepatitis c virus between spouses: the importance role of exposure duration. **Am. J. Gastroenterol.**, **91**:2087-2090, 1996.

KOMIYAMA, K.; MORO, I.; MASTSUDA, Y.; MORSHED, S.; NISHIOKA, M.; HAYASHI, N.; SHIAKATA, T. HCV in saliva of chronic hepatitis patients having dental treatment. **Lancet**, **338**:572-573, 1991.

KOMIYAMA, K.; KAWAMURA, F.; ARAKAWA, Y.; MASTUO, H.; HAYASHI, N.; MORO, I. Detection of hepatitis C virus (VHC)-RNA in saliva and gastric juice. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **371B**: 995-997, 1995.

KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER, H. J.; GITNICK, G. L.; REDEKER, A. G.; PURCELL, R. H.; MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J. L.; ALTER, M. J.; STEVENS, C. E. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, **21**:362-364, 1989.

LERAT, H.; RUMIN, S.; HABERSETZER, F.; BERBY, F.; TRABAUD, M. A.; TREPO, C.; INCHAUSPE, G. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. **Blood**, **15**:3841-3849, 1998.

LIU, T. C.; CHANG, T. T.; YOUNG, K.C.; LIN, X. Z.; LIN, C. Y.; WU, H. L. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. **J. Med. Virol.**, **37**:197-202, 1992.

LODI, G.; PORTER, S. R. Occupational risk of hepatitis C virus infection to dental health care staff: an update. **Dental Update**, **23**:255-258, 1996.

LODI, G.; PORTER, S. R. Hepatitis C virus infection and lichen planus: a short review. **Oral Dis.**, **3**:77-81, 1997.

LOK, A.S.; GUNARATNAM, N. T. Diagnosis of hepatitis C. **Hepatology**, **26**:48S-56S. 1997

MATICIC, M.; POLJAK, M.; KRAMAR, B.; SEME, K.; BRINOVEC, V.; MEGLIC-VOLKAR, J.; ZAKOTNIK, B.; SKALERIC, U. Detection of hepatitis C virus RNA from gingival crevicular fluid and its relation to virus presence in saliva. **J. Periodontol.**, **72**:11-16, 2001.

MCINTYRE, P. G.; LASZLO, J.; APPLEYARD, K.; OGDEN, G.R. Modified enzyme immunoassay to detect hepatitis C virus antibodies in oral fluid. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **15**:882-884, 1996.

MEISEL, H.; REIP, A.; FALTUS, B. Transmission of hepatitis C virus to children and husbands by woman infected with contaminated anti-D immunoglobulin. **Lancet**, **345**:1209-1211, 1995.

MIGNOGNA, M. D.; FEDELE, S.; Lo RUSSO, L.; RUOPPO, E.; ADAMO, D.; Lo MUZIO, L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection: the slowly unraveling picture of oral lichen planus. **J. Hepatol.**, **37**:412-413, 2002.

MOYER, L. A.; MAST, E. E.; ALTER, M. J. Hepatitis C: Part I. Routine serologic testing and diagnosis. **Am. Fam. Physician.**, **59**:79-88, 1999.

MONTEBUGNOLI, L.; DOLCI, G. Anti-HCV antibodies are detectable in the gingival crevicular fluid of HCV-positive subjects. **Minerva Stomatol.**, **49**:1-8, 2000.

NAGAO, Y.; SATA, M.; TANIKAWA, K.; ITOH, K.; KAMEYAMA, T. Lichen planus and hepatitis C virus in the northern Kyushu region of Japan. **Eur. L. Clin. Invest.**, **25**:910-914, 1995.

NAGAO, Y.; SATA, M.; TANIKAWA, K.; ITOH, K.; KAMEYAMA, T. High prevalence of hepatitis C virus antibody and RNA in patients with oral cancer. **J Oral. Pathol. Med.**, **24**:354-360, 1995.

NAGAO, Y.; SEKI, N.; TAMATSUKURI, S.; SATA, M. Detection of hepatitis C virus in saliva before and after scaling of dental calculus. **Kansenshogaku Zasshi**, **74**:961-965, 2000.

NAKANO, I.; IMOTO, M.; FUKUDA, Y.; KOYAMA, Y.; URANO, F.; KANDA, N.; ISOBE, K. Hepatitis C virus RNA in urine, saliva, and sweat. **Am. J. Gastroenterol.**, **87**:1522, 1992.

NUMATA, N.; OHORI, H.; HAYAKAWA, Y.; SAITOH, Y.; TSUNODA, A.; KANNO, A. 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.**, **41**:120-128, 1993.

OGASAWARA, S.; KAGE, M.; KOSAI, K.; SHIMAMATSU, K.; KOJIRO M. Hepatitis C virus RNA in saliva and breastmilk of hepatitis C carrier mothers. **Lancet**, **341**:561, 1993.

PAPANOU, P. N.; LINDHE, J.: Epidemiologia da Doença Periodontal. In: LINDHE, J; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clinica e implantodontia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 2, p.43-65.

PIAZZA, M.; BORGIA, G.; PICCIOTTO, L.; NAPPA, S.; CICCARELLO, S.; ORLANDO, R. Detection of hepatitis C virus-RNA by polymerase chain reaction in dental surgeries. **J. Med. Virol.**, **45**:40-42, 1995.

PUCHHAMMER-STOCKL, E.; MOR, W.; KUNDI, M.; HEINZ, F.; HOFMANN, H.; KUNZ, C. Prevalence of hepatitis C virus RNA in serum and throat washing of children with chronic hepatitis. **J. Med. Virol.**, **43**:143-147, 1994.

REY, D.; FRITSCH, S.; SCHMITT, C.; MEYER, P.; LANG, J. M.; STOLL-KELLER, F. Quantitation of hepatitis C virus RNA in saliva and serum of patients coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus. **J. Med. Virol.**, **63**:117-119, 2001.

RIDZON, R.; GALLAGHER, K.; CIESIELSKI, C. Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needlestick injury. **N. Engl. J. Med.**, **336**:919-922, 1997.

ROY, K. M.; BAGG, J.; BIRD, G. L. Serological and salivary markers compared with biochemical markers for monitoring interferon treatment for hepatitis C virus infection. **J. Med. Virol.**, **47**:429-434, 1995.

ROY, K. M.; BAGG, J.; FOLLETT, E. A.; BREWER, A.; LOWE, G. D. Hepatitis C virus in saliva of haemophiliac patients attending an oral surgery unit. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, **34**:162-165, 1996.

ROY, K. M.; BAGG, J.; MCCARRON, B.; GOOD, T.; CAMERON, S.; PITHIE, A. Predominance of HCV type 2a in saliva from intravenous drug users. **J. Med. Virol.**, **54**:271-275, 1998.

SAVOLDI, E.; GARGIULO, F.; MARINONE, M. G.; FAVILLI, F.; CALLEA, F.; SAPELLI, P. L.; TURANO, A. HCV-RNA occurrence in saliva of odontoiatric HCV seropositive patients. **Minerva Stomatol.**, **50**:71-74, 2001.

SEEFF, L. B. Hepatitis C from a needlestick injury. **Ann. Intern. Med.**, **115**, 1991.

SHERMAN, K. E.; CREAGER, R. L.; O'BRIEN, J.; SARGENT, S.; PIACENTINI, S.; THIEME, T. The use of oral fluid for hepatitis C antibody screening. **Am. J. Gastroenterol.**, **89**:2025-2027, 1994.

SANTANA, N. **Significado do anti-VHC em doadores de sangue na cidade de Salvador- Bahia.** 1995. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SILVA, L. R.; PARANÁ, R.; MOTA, E.; COTRIM, H.P.; BOENNEC-McCURTEY, M. L.; VITVITINSKY, L.; PADUA, A.; TREPÓ, C.; LYRA, L. Prevalence of hepatitis C virus in urban and rural populations of northeast Brazil-pilot study. **Arq. Gastroenterol.**, **32**: 168-171, 1995.

SILVA, L.K.; PARANÁ, R.; SOUZA, S.P.; BERBY, F. KAY, A.; TREPO, C.; SANTANA, N.; COTRIM, H.; LYRA, L. G., REIS, M.G. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, **62**:257-260, 2000.

SUGIMURA, H.; YAMAMOTO, H.; WATABIKI, H.; OGAWA, H.; HARADA, H.; SAITOH, I.; MIYAMURA, T.; INOUE, M.; TAJIMA, K.; KINO, I. Correlation of detectability of hepatitis C virus genome in saliva of elderly Japanese symptomatic HCV carriers with their hepatic function. **Infection**, **23**:258-262, 1995.

TAKAMATSU, K.; KOYANAGI, Y.; OKITA, K.; YAMAMOTO, N. Hepatitis C virus RNA in saliva. **Lancet**, **15**:336:1515, 1990.

TANG, Z.; YANG, D.; HAO, L.; TANG, Z.; HUANG, Y.; WANG, S. Detection and significance of HCV RNA in saliva, seminal fluid and vaginal discharge in patients with hepatitis C. **J. Tongji Med. Univ.**, **16**:11-13, 1996.

TREMOLADA, F.; CASARIN, C.; TAGGER, A. Antibody to hepatitis C virus in post-transfusion hepatitis. **Ann. Intern. Med.**, **114**:277-281, 1991.

TUCKER, S. C.; COULSON, I. H. Lichen planus is not associated with hepatitis C virus infection in patients from north west England. **Acta. Derm. Venereol.**, **79**:378-379, 1999.

VAGLIA, A.; NICOLIN, R.; PURO, V.; PURO, V.; IPPOLITO, G.; BTTINI, C.; De LALLA, F. Needlestick hepatitis C seroconversion in a surgeon. **Lancet**, **336**:1315-1316, 1990.

VAN DOORNUM, G. J.; LODDER, A.; BUIMER, M.; VAN AMEIJDEN, E. J.; BRUISTEN, S. 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.**, **64**:13-20, 2001.

WANG, J. T.; WANG, T. H.; LIN, J. T.; SHEU, J. C.; LIN, S. M.; CHEN, D. S. Hapatitis C virus RNA in saliva of patients with pos-transfusion hepatitis C infection. **Lancet**, **337**:48, 1991.

WANG, J. T.; WANG, T. H.; SHEU, J. C.; LIN, J. T.; LIN, S. M.; CHEN, D. S. Hapatitis C virus RNA in saliva of patients with pos-transfusion hepatitis C infection and low efficiency of transmission among spouses. **J. Med. Virol.**, **36**:28-31, 1992.

WANG, J. T.; SHEU, J.C.; LIN, J.T.; WANG, T.H.; CHEN, D.S. Detection of replicative form of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, **166**:1167-1169, 1992.

WATTIAUX, M. J.; Syndrome de Gourgerot Sjögren et virus de l'hépatite C : quels liens ? **Presse. Med.**, **26**: 652-655, 1997.

World Health Organization. Hepatitis C. WHO Fact Sheet No 164. Disponível em: <http://www.who.int/factsh/e/factsh164.html>. Acesso em: 3 jan. 2002.

YOUNG, K. C.; CHANG, T. T.; LIOU, T. C.; WU, H. L. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. **J. Méd. Virol.**, **41**:55-60, 1993.

ZARIFE, M. A. S. **Prevalência da infecção pelo vírus C (VHC) em Salvador-Bahia**. 2002. 69f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de medicina da Universidade Federal da Bahia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ, Salvador - Bahia.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

Instituições de pesquisa: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-HUPES/UFBA/HEMOBA.

Título do projeto:

Detecção do vírus da hepatite C (VHC) na saliva de pacientes portadores do anticorpo anti-VHC que procuram o serviço de hepatologia do HUPES/UFBA e do HEMOBA na cidade de Salvador-BA.

Pesquisadores Responsáveis: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Dr. Raimundo Paraná Filho e Dr. Luís Guilherme Costa Lyra.

Este documento procura fornecer ao(a) Sr.(Sra.) informações sobre a pesquisa a ser realizada, esclarecendo os procedimentos e exames, benefícios e inconveniências. O(A) Sr.(Sra.). poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou dela se afastar a qualquer tempo, sem que venha a sofrer qualquer constrangimento ou penalidade por parte das instituições de pesquisa.

O objeto da pesquisa é o estudo da hepatite humana causada pelo vírus da hepatite C (VHC) (1) em populações sob risco, (2) portadores assintomáticos, pacientes com infecção aguda e crônica, com sorologia positiva para o anticorpo anti-VHC acompanhados no Serviço de Gastro-Hepatologia/HUPES para determinar a associação dos diversos tipos do VHC com informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas e (4) obter informações para identificar grupos potenciais para a aplicação de medicamentos anti-virais.

Os procedimentos e exames que serão realizados incluem: (1) coleta de aproximadamente 15mL de sangue da veia; (2) coleta de aproximadamente 5ml de saliva para detecção do RNA do VHC (VHC-RNA); (3) exame clínico bucal; (4) identificação do anticorpo anti-VHC, apenas nos casos que não possuem resultados prévio deste exame; (5) exames moleculares para detecção e genotipagem do RNA do VHC (VHC-RNA). Os riscos e danos da pesquisa são praticamente nulos. Os pacientes participantes receberão os resultados dos exames sobre a infecção pelo VHC além do tipo do vírus. Este estudo contribuirá para o entendimento da transmissão do VHC e a identificação de grupos que possam ser beneficiados pelo tratamento com anti-virais.

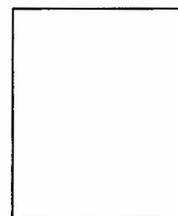
Os investigadores se obrigam a não revelar sua identidade em nenhuma circunstância. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos. Todos os dados colhidos para a avaliação clínico-epidemiológica estarão codificados no computador, sob sigilo, não permitindo sua identificação.

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 _____

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

ANEXO B

Deteccao do virus da hepatite C na saliva e correlacoes com patologias bucais

- 1 {Cod}igo do paciente: <A >
- 2 {Exp}erimental (Sim=1, Nao=2): #
- 3 {Gen}otipo (g1=0, g3=1, g1/3=2): #
- 4 {ISG}: #.##
- 5 {CPOD}: ##
- 6 {Sang}ramento {geng}ival (Ausente=0, Intenso=1, Moderado=2, Leve=3): #
- 7 {Mob}ilidade {dent}aria (Ausente=0, GI=1, GII=2, GIII=3, GIV=4): #
- 8 {Dor} (Ausente=0, Dente=1, Mucosa=2, ATM=3, Gengiva=4, Glandulas salivares=5, Musculos=6): #
- 9 {Diabetes} (1=Sim, Nao=2): #
- 10 {Pneum}onia (1=Sim, Nao=2): #
- 11 {D}oenca {renal} {cr}onica (1=Sim, Nao=2): #
- 12 {Sinus}jite (1=Sim, Nao=2): #
- 13 {Rin}ite (1=Sim, Nao=2): #
- 14 {Brux}ismo (1=Sim, Nao=2): #
- 15 {Apert}amento (1=Sim, Nao=2): #
- 16 {Herpes} (Labial=1, Ausente=2, Genital=3): #
- 17 {Sifilis} (1=Sim, Nao=2): #
- 18 {SIDA} (1=Sim, Nao=2): #
- 19 {Pat}ologia {bucal} (1=Sim, Nao=2): #
- 19.1. Se sim, qual(ais) (Sim=1, Nao=2)?
- A. {Geng}ivite: #
- B. {Periodon}tite: #
- C. {Granul}oma piogenico: #
- D. Hiperplasia {papiloma}tosa do palato: #
- E. {Afta}: #
- F. Ulcera {aftose} recidivante: #
- H. {Sial}o{lit}iase: #
- I. {Sial}a{den}jite: #
- K. {Macula} melanotica: #
- L. Hiper{cerat}ose focal: #
- M. {Leucopl}asia: #
- N. {Erit}ro{pla}sia: #
- O. {Liquen} plano: #
- P. {Tum}or de {gland}ulas salivares: #
- Q. {CEC}: #
- R. {Cist}o {derm}oide: #
- S. {Ranula}: #
- T. {Muco}cele: #
- U. {Xer}ostomia: #
- 20 {Exhomo} (Sim=1, Nao=2): #
- 21 {SexoAnal} (Sim=1, Nao=2): #
- 22 Uso de {Drogas}ilicitas (Sim=1, Nao=2): #
- 23 {Acunp}utura (Sim=1, Nao=2): #
- 24 {Hemot}ransfusao (Sim=1, Nao=2): #
- 25 {Inj}ecao com {agulhas ou {ser}nao descartaveis (Sim=1, Nao=2): #
- 26 {Tatua}gem (Sim=1, Nao=2): #
- 27 {Pierc}ing (Sim=1, Nao=2): #
- 28 {Cel}ulas epiteliais no {esfr}egaco: ###
- 29 {Linf}ocitos no {esfr}egaco: ###
- 30 {Id}ade: ##
- 31 {Ge}nero (Masculino=1, Feminino=2): #
- 32 {Ra}ca (Leucoderma=1, Faioderma=2, Melanoderma=3): #
- 33 {Esc}olaridade (Analfabeto=1, 1o grau=2, 2o grau=3, 3o grau=4): #
- 34 {Carg}a viral: #####□

ANEXO C

Elaboração	Nome: Luciano Kalabric Silva Cargo: Doutorando-LPBM	Aprovaçã o e Liberação	Nome: Mitermayer G. dos Reis Cargo: Chefe-LPBM
	Visto:		Visto:
	Data: 01/01/1995		Data:

1 Situação da revisão

Situação	Data	Alteração
1.0	09/02/2001	1.1

2 Objetivo

Extrair o RNA total de amostras de soro.

3 Campo de Aplicação

Este protocolo pode ser utilizado para a purificação de qualquer tipo de RNA a partir de amostras poucos contaminadas, tais como, soro (não hemolisado), urina e saliva. Em combinação com protocolos de RT-PCR permite a detecção de agentes infeccioso cujo genoma é RNA: HIV, vírus da dengue, vírus da febre amarela, vírus da hepatite A, C, D, E, G, etc.

4 Terminologia, Definição e Símbolos

água DEPC – água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC)

GuSCN – tiocianato de guanidina

5 Descrição

5.1 Base do Método

A técnica pode ser dividida em 3 etapas: extração, precipitação e secagem. Durante a etapa de extração o RNA é separado da maioria dos contaminantes orgânicos pela extração com uma mistura desnaturante constituída de fenol:clorofórmio:GuSCN:2-mercaptoetanol. Após centrifugação, o RNA permanece solubilizado na fase aquosa superior e é transferido para um tubo limpo contendo etanol e acetado de sódio. Nesta condições, o RNA é precipitado após resfriamento à baixa temperatura e ultracentrifugação. Durante a precipitação, os contaminantes de baixo peso molecular, solúveis (sais, monômeros, etc.), são eliminados enquanto o RNA fica cristalizado no fundo do tubo. Finalmente, o RNA é desidratado com etanol (95%) e seco.

5.2 Equipamentos e Materiais

galeria para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL

gaze estéril

micropipetadores de 20µL, 100µL, 200µL, 1000µL

ponteiras livres de RNase, estéreis, amarelas e azuis, com barreira

tiras de papel toalha estéreis

tubos de microcentrifuga de 1,5 mL estéreis

ultra-microcentrifuga refrigerada

5.3 Reagentes

2-mercaptoetanol

acetato de sódio 3M pH5,5 estéril

água DEPC

clorofórmio:álcool isoamílico P.A. (24:1)

etanol 80% preparado com água DEPC

etanol P.A. (95%)

fenol saturado em água DEPC

glicogênio (Gibco BRL 10814-010 ou similar)

solução de tiocianato de guanidina² (GuSCN)

* Todas as soluções devem ser preparadas com água DEPC.

5.4 Procedimentos

Os itens 1, 2, 3, 4 e 13 devem ser realizados preferencialmente no fluxo laminar. Os demais itens poder ser realizados na bancada tomando-se os devidos cuidados para evitar contaminação e degradação das amostras.

1. Prepare a solução de desnaturação (solução D) em volume suficiente para o total de amostras:

<u>1x</u>	<u>n X</u>
200 μ L	fenol saturado em água
70 μ L	água DEPC
79,2 μ L	GuSCN
0,8 μ L	2-mercaptoetanol (100:1)
5 μ L	solução de glicogênio 20 μ g/ μ L

2. Identifique dois tubos de microcentrifuga de 1,5mL para cada amostra. Numere na tampa dos tubos (tubo 1 e 2) a ordem das amostras (1, 2, 3 ...). Somente na segunda série dos tubos (tubo 2), rotule na lateral o código da amostra e outras informações que julgar necessárias. Após o experimento estes tubos poderão constituir uma biblioteca de cDNA;

3. Adicione no tubo 1: 355 μ L de solução D, 35 μ L de clorofórmio:al.amílico 24:1 e 200 μ L de amostra (200 μ L de soro, ou 100 μ L de soro + 100 μ L água DEPC). Agite vigorosamente por 10". Alguns protocolos utilizam vortéx por 1min;

4. Centrifugue os tubos 1 a 12.000rpm por 10' à 0°C;

5. Enquanto isso, adicione nos tubos 2: 700 μ L de etanol P.A. (95%) e 30 μ L de acetato de sódio 3M pH5,5;

6. Transfira cuidadosamente a fase aquosa superior (aprox. 300-400 μ L) para o tubo 2.

7. Descarte os tubos com fenol em local apropriado;

8. Homogenize por 10-15" e mantenha no congelador (-20°C) por 20' para precipitar. Pode-se interromper o experimento nesta etapa. Nesse caso, recomenda-se manter os tubos à -70°C.

9. Centrifugue os tubos a 12.000rpm por 20' à 0°C;

10. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;

11. Adicione 1mL de etanol 80% em cada tubo. Centrifugue os tubos a 12.000rpm por 5' à 0°C. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;

12. Adicione 1mL de etanol P.A. em cada tubo. Centrifugue os tubos a 12.000rpm por 5' à 0°C. Despreze a fase alcóolica por inversão dos tubos tomando cuidado para não perder o precipitado, caso seja visível;

12. Forre uma superfície do fluxo laminar com papel alumínio e papel toalha ou absorvente. Mantenha os tubos emborcados sobre esta superfície por 15' para secar;
13. Afim de evitar a degradação do material é recomendável prosseguir imediatamente a transcrição reversa, caso contrário, dissolva o precipitado em 14µL de água DEPC e congele a -70°C.

6.1 RT - transcrição reversa (do inglês, *reverse transcriptase*);

6.2 PCR - reação da polimerase em cadeia (do inglês, *polimerase chain reaction*);

6.3 dNTP - desoxinucleotídeos trifosfatos: refere-se aos dATP, dGTP, dCTP e dTTP, precursores para síntese de DNA;

6.4 TA - temperatura ambiente;

6.5 RM - mistura de reagentes (do inglês, *reaction mix*)

6.6 pb - pares de base

6 Controle de Registros

Não aplicável.

7 Anexos

Não aplicável.

8 Referências

1. CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. **Anal Biochem** **162**: 156-9, 1987.
2. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3. v.
3. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Preparo dos principais reagentes de biologia molecular (POP011). Salvador: CPqGM, 2000.

ANEXO D

VHC/5'NCR RT-Nested PCR (Davidson, 1994)

1) Extração do VHC-RNA

Data:

/ /

Amostra	Identificação	Resultado	Amostra	Identificação	Resultado
1			13		
2			14		
3			15		
4			16		
5			17		
6			18		
7			19		
8			20		
9			21		
10			22		
11			23		
12			24		

2) Métodos

Data:

/ /

1º PCR

- Distribuir em cada tubo 21ul do mix e adicionar 4ul do cDNA. Programa de temperaturas **GEN-DAV**: 94°C 3min.; 25 ciclo: 94°C 25s, 50°C 35s, 68°C 2,5min; 68°C 10min.; 4°C forever. Produto 5'NCR: 306pb.

2º PCR

- Distribuir em cada tubo 99ul do mix e adicionar 1ul do produto da 1º PCR. Programa de temperaturas: **GEN-DAV**. Produto 5'NCR: 251pb.

TRANSCRIPTASE REVERSA			1° PCR			2° PCR		
	X 1	X		X 1	X		X 1	X
H2O DEPC	14,0		H2O* Mill-Q	16,8		H2O* Mill-Q	83,2 80,0	
5X BUFFER	5,0		10X BUFFER s/ Mg ⁺⁺	2,5		10X BUFFER s/ Mg ⁺⁺	10,0	
DTT 0,1 M	2,0		MgCl ₂ * 50mM	--- 0,8		MgCl ₂ * 50mM	3,2 6,4	
dNTPs 10 mM	1,0		dNTPs 10 mM	0,1		dNTPs 10 mM	0,4	
random primer 50uM	1,0		939 s 50pmoles/ul	0,3		940 s 50 pmoles/ul	1,0	
RNAsin 10U/ul	1,0		209 as 50pmoles/ul	0,3		211 as 50 pmoles/ul	1,0	
MMLV 200U/ul	1,0		Taq 5U/ul	0,2		Taq 5U/ul	0,2	
TOTAL	25,0		TOTAL	21,0		TOTAL	99,0	

* TP 10X = 2,5ul; H2O = 20,7ul; Mg⁺⁺ = ---ul
42,6ul; Mg⁺⁺ = ---ul

* TP 10X = 5,0ul; H2O =

TP 10X minus Mg⁺⁺ = 2,5ul; H2O = 19,9ul; Mg⁺⁺ = 0,8ul.
Mg⁺⁺ = 5,0ul; H2O = 41,0ul; Mg⁺⁺ = 1,6ul.

TP 10X minus

Eletróforese (Tipagem e Sub-tipagem)

Data: ___/___/___

- Preparar 100mL de agarose Metaphor a 4,0% em TAE 1X. Transferir a agarose para um molde com 2 pentes largos de 12 poços. Aguardar solidificar e retirar os pentes. Montar o gel na cuba de eletróforese contendo TAE 1X. Misturar 5µL do tampão de carregamento (6x) a 25µL de cada amostra e aplicar 25-30µL desta mistura no gel. Proceder a corrida durante 30min.-1H em 100V. Parar a corrida quando o corante referente ao azul de bromofenol estiver à metade do gel.
- Fotografar o gel no Eagle Eye utilizando o método Dinâmico de integração de imagem (Reset para Start count=1 e Increment count=1). Ajuste a câmara para abertura 1,2 e zoom 20. O foco e o tempo de leitura são variáveis.

ANEXO E

Genotipagem VHC/5'NCR RT-Nested PCR (*Davidson, 1994*)

Eletroforese em Metaphor agarose 4,0%

1) Extração do VHC-RNA

Data:

____/____/____

Amostra	Identificação	Resultado	Amostra	Identificação	Resultado
1			13		
2			14		
3			15		
4			16		
5			17		
6			18		
7			19		
8			20		
9			21		
10			22		
11			23		
12			24		

2) Métodos

Data:

____/____/____

1º PCR

- Distribuir em cada tubo 21ul do mix e adicionar 4ul do cDNA. Programa de temperaturas **GEN-DAV**: 94°C 3min.; 25 ciclo: 94°C 25s, 50°C 35s, 68°C 2,5min; 68°C 10min.; 4°C forever. Produto 5'NCR: 306pb.

2º PCR

- Distribuir em cada tubo 99ul do mix e adicionar 1ul do produto da 1º PCR. Programa de temperaturas: **GEN-DAV**. Produto 5'NCR: 251pb.

TRANSCRIPTASE REVERSA	1º PCR		1º PCR		2º PCR		2º PCR	
	X 1	X _____	X 1	X _____	X 1	X _____	X 1	X _____
H2O DEPC	14,0		H2O* Mill-Q	16,8		H2O* Mill-Q	83,2	
5X BUFFER	5,0		10X BUFFER s/ Mg++	2,5		10X BUFFER s/ Mg++	10,0	
DTT	2,0		MgCl ₂ *	---		MgCl ₂ *	3,2	

0,1 M			50mM	0,8		50mM	6,4	
dNTPs 10 mM	1,0		dNTPs 10 mM	0,1		dNTPs 10 mM	0,4	
random primer 50uM	1,0		939 s 50pmoles/ul	0,3		940 s 50 pmoles/ul	1,0	
RNAsin 10U/ul	1,0		209 as 50pmoles/ul	0,3		211 as 50 pmoles/ul	1,0	
MMLV 200U/ul	1,0		Taq 5U/ul	0,2		Taq 5U/ul	0,2	
TOTAL	25,0		TOTAL	21,0		TOTAL	99,0	

* TP 10X = 2,5ul; H2O = 20,7ul; Mg⁺⁺ = ---ul
42,6ul; Mg⁺⁺ = ---ul

* TP 10X = 5,0ul; H2O =

TP 10X minus Mg⁺⁺ = 2,5ul; H2O = 19,9ul; Mg⁺⁺ = 0,8ul.

TP 10X minus

Mg⁺⁺ = 5,0ul; H2O = 41,0ul; Mg⁺⁺ = 1,6ul.

Eletrforese (Tipagem e Sub-tipagem)

Data: ____/____/____

- Preparar 100mL de agarose Metaphor a 4,0% em TAE 1X. Transferir a agarose para um molde com 2 pentes largos de 12 poços. Aguardar solidificar e retirar os pentes. Montar o gel na cuba de eletrforese contendo TAE 1X. Misturar 5 μ L do tampão de carregamento (6x) a 25 μ L de cada amostra e aplicar 25-30 μ L desta mistura no gel. Proceder a corrida durante 30min.-1H em 100V. Parar a corrida quando o corante referente ao azul de bromofenol estiver à metade do gel.
- Fotografar o gel no Eagle Eye utilizando o método Dinâmico de integração de imagem (Reset para Start count=1 e Increment count=1). Ajuste a câmara para abertura 1,2 e zoom 20. O foco e o tempo de leitura são variáveis.

ANEXO F

Wright

FINALIDADE

Método para coloração de células de sangue periférico, medula óssea ou para estudo citológico de elementos celulares. Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Corante segundo Wright.

O corante Wright é uma mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células.

REAGENTES

Número 1 - Corante Wright - conservar entre 15 e 30°C. Contém: Corante Wright 100 mg/dL.

APRESENTAÇÃO

Reagente----- Volume

Reagente No 1.....500 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Suporte para coloração, relógio ou cronômetro, pipetas, lâminas.

Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento e transporte deverá ser de 15 a 30°C.

Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico in vitro;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta;
- 3 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes;
- 4 - Manusear o reagente com cuidado, evitar o contato com a pele e mucosas;
- 5 - As lâminas para confecção dos esfregaços devem estar limpas e isentas de gordura;
- 6 - A gota de sangue utilizada para a confecção do esfregaço não deve ser muito grande, pois quanto maior a gota, mais espesso o esfregaço;
- 7 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.

AMOSTRAS

Sangue periférico colhido por punção digital ou coleta venosa, sem anticoagulante ou com uso de EDTA Bioclin. Os esfregaços devem ser feitos de preferência sem o uso de anticoagulantes. As lâminas feitas a partir de sangue colhido com anticoagulantes devem ser confeccionadas até 30 minutos após a coleta, para evitar deformações celulares.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Técnica

Colocar a lâmina no suporte de coloração.

- 1 - Recobrir o esfregaço com 20 gotas do corante. Aguardar de um a três minutos;
- 2 - Adicionar 20 gotas de água de torneira. Homogeneizar a mistura corante e água. Aguardar a coloração de três a cinco minutos;
- 3 - Lavar a lâmina em água corrente;
- 4 - Deixar secar em posição vertical;
- 5 - Examinar com objetiva de imersão.

RESULTADOS

Hemácias: coloração rósea

Plaquetas: coloração azulada.

Neutrófilos: núcleo azul escuro e citoplasma rosa pálido com granulações que variam do rosa ao azul claro;

Linfócitos: núcleo azul violeta e o citoplasma azul;

Basófilos: núcleo púrpura a azul escuro e citoplasma com granulações

volumosas azul escuro;

Monócitos: núcleo azul violeta e citoplasma azul claro;

Eosinófilos: núcleo azul e citoplasma rosa pálido com grânulos volumosos que variam do vermelho ao laranja.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Os esfregaços que apresentarem coloração azul ou esverdeada, estão alcalinos devido ao tempo prolongado de ação do corante, esfregaços grossos ou lavagem insuficiente da lâmina.

Os esfregaços que apresentarem coloração vermelha, estão excessivamente ácidos devido a coloração insuficiente, tempo de lavagem excessivo ou acidez do corante.

Os precipitados podem aparecer quando as lâminas estão mal lavadas, com poeira ou quando ocorre secagem do corante durante o processo de coloração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - WALF., Pratical Clinical Hematology Interpretation and Techniques, 375-376, 1973.

2 - LIMA, O. A.; SOARES, J.B.; GALIZZI, J.; GRECO, J. B.; CANÇADO J. R., 12-21, 1992.

3 - CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S., Hematologia, Técnicas Laboratoriais e Interpretação, 28-32, 1988.