

**DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC) EN SALIVA DE PACIENTES
CRONICAMENTE INFECTADOS DE CORDOBA, ARGENTINA.**

**HEPATITIS C VIRUS (HCV) DETECTION IN SALIVA OF CHRONICALLY INFECTED PATIENTS
FROM CORDOBA, ARGENTINA.**

Adrián Farías,^{1*} Viviana Ré,^{1,4} Silvia Mengarelli,² Luis Kremer,³ María Belén Pisano,¹ Luis Allende,³ Juan Nicolás,⁴ Osvaldo Elbarcha,⁴ Marta Contigiani¹.

RESUMEN

La posibilidad de transmisión no parenteral del virus de la Hepatitis C (VHC) se sustenta por la actual demostración del virus en diferentes fluidos biológicos. En este estudio, investigamos la relación entre la detección de ARN de VHC en la saliva de pacientes crónicamente infectados con este virus y varios factores virales y del huésped. MÉTODOS: Se estudiaron 16 individuos coinfectados VIH/VHC y 21 pacientes monoinfectados con VHC, con media de edad de 38 y 45, respectivamente. El ARN de VHC se detectó mediante transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Los genotipos fueron detectados usando RFLP y secuenciamiento directo a partir de los productos de PCR, la carga viral se determinó usando NASBA HCV-QT. RESULTADOS: Detectamos ARN de VHC en 21,6% de las salivas analizadas. No se halló diferencia estadísticamente significativa en relación a la carga viral, genotipo, coinfección VIH/VHC y factores epidemiológicos del huésped. CONCLUSIONES: Nuestros datos sugieren que el VHC puede ser detectado en la saliva de los pacientes crónicamente infectados independientemente de estos cofactores, incluyendo carga viral y coinfección VIH/VHC. Nuevos estudios sobre dinámica de VHC serán necesarios a fin de profundizar en el conocimiento de la transmisión no parenteral de este virus.

Palabras claves:

ABSTRACT

The possibility of the non-parenteral Hepatitis C Virus (HCV) transmission is supported by the demonstration that the actual virus is present in several body fluids. In this study, we investigated the relationship between the detection of HCV RNA in saliva from chronically HCV-infected patients and several viral and host factors. METHODOLOGY: This study comprised 16 HIV/HCV coinfecting and 21 HCV monoinfecting patients with a median age of 38 and 45 years, respectively. HCV-RNA was detected in serum and saliva samples by reverse transcription-nested polymerase chain reaction. Genotypes were determined by using RFLP and direct nucleotide sequencing of the PCR products and plasma viral loads by using NASBA HCV-QT. RESULTS: We detected presence of RNA HCV in 21.6% of saliva samples analyzed. When compared on the basis of the results of the detection of HCV-RNA in saliva, patients did not differ significantly in relation to viral load, genotype, HCV/HIV coinfection, and epidemiological host factors. CONCLUSIONS: Our data suggest that HCV can be detected in saliva of chronically HCV-infected patients independent of these cofactors, including circulating HCV load and HCV/HIV coinfection. Studies on HCV dynamics are needed to gain insights into nonparenteral transmission of HCV.

Keywords:

¹ Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

² Hospital San Roque-Córdoba, Argentina.

³ Hospital Nacional de Clínicas-Córdoba, Argentina.

⁴ Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

* Autor: Adrián Alejandro Farías, Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella" Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Enfermera Gordillo Gómez s/n Ciudad Universitaria CP: 5016, Córdoba, Argentina.

INTRODUCCION

En los últimos 20 años el virus de la hepatitis C (VHC) ha emergido como la segunda principal causa de infección viral luego del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se estima que aproximadamente el 3% de la población mundial está infectada con VHC y ésta infección es crónica en el 80% de los casos (1).

El VHC comparte vías de transmisión con VIH, pero las tasas de infección están relacionadas al nivel de exposición de la población involucrada. Así, la coinfección VIH/VHC representa un gran problema en crecimiento. Esta coinfección acelera la progresión de injuria y descompensación hepática provocada por VHC, parece empeorar la progresión de la infección por VIH e incrementa la transmisión de VHC (2).

En Córdoba, un estudio reciente en individuos VIH (+), demostró una alta prevalencia de HCV (12,3%), representada por el genotipo 1 y asociada principalmente al uso de drogas inyectables. Sin embargo, el hallazgo de ARN de VHC en 10,5% de los individuos sin antecedentes de riesgo parenteral sugería una vía alternativa de transmisión (3).

Si bien, la vía de transmisión parenteral se considera la más eficiente, en aproximadamente 30% de los casos se desconoce la ruta de infección (1). Por esto, se han propuesto otras vías posibles de transmisión, de riesgo incierto, que podrían estar relacionadas a la infección por VHC como son: el uso de tatuajes, el uso de cocaína inhalatoria, acupuntura y procedimientos médico- odontológicos (4, 5, 6).

Estudios recientes han demostrado la presencia de ARN de VHC en saliva de individuos crónicamente infectados, lo cual sugiere a ésta como otra posible vía de infección (7). A su vez, se ha demostrado que niveles mayores de carga viral favorecerían la detección de VHC en saliva (7, 8, 9). El aumento de la replicación de VHC favorecido por la inmunosupresión en pacientes VIH (+) y/o por la presencia de infección VHC aguda, podría estar asociada a un aumento de la replicación viral en células mononucleares de sangre periférica y células epiteliales de la

mucosa genital u oral, en las que se demostró que poseen un receptor celular (CD81) que une la proteína de la envoltura del VHC y produce la internalización del virus (10). Esto podría explicar el hallazgo de VHC en otros fluidos biológicos, que podrían estar involucrados en la transmisión del virus (10). El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de ARN en la saliva de individuos crónicamente infectados y estudiar el real impacto de la coinfección con VIH, y su asociación con la carga viral, el genotipo VHC, factores de riesgo y edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y toma de muestras

Se estudiaron 37 pacientes (21 males/16 mujeres), dieciséis de ellos eran coinfectados con VIH. Todos los sujetos tenían ARN del VHC detectable en el suero mediante RT-Nested PCR y no se encontraban bajo tratamiento antiviral. Las muestras de suero fueron re-analizadas para confirmar la presencia de ARN del VHC en el momento de tomar las de saliva. Todos los especímenes fueron congeladas a -70°C hasta la detección del ARN viral. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba y se llevó a cabo de acuerdo con las normas de ética internacionales. Se obtuvo el Consentimiento informado por escrito de todos los pacientes incluidos en este estudio.

Procesamiento de Suero y Saliva

En todos los pacientes, se recolectó muestras de sangre y se separó el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras de saliva se recogieron sin estimulación mecánica en un tubo (*Falcon*) estéril. La saliva fue procesada por centrifugación y se realizó un control visual para detectar la presencia de células de la sangre. Ninguna de las muestras contenía sangre en el examen macroscópico.

Extracción de ARN

A partir de suero, la extracción de ARN viral se realizó con el reactivo Trizol LS (Invitrogen, Life

Technologies, Rockville, MD). En las muestras de saliva se utilizó el ARN viral QIAamp Kit (QIAGEN GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

RT-nested PCR

La presencia de ARN del VHC se determinó mediante la técnica de RT-nested PCR utilizando primers específicos de la región 5' no codificante (5'NCR), como fue descrito por Ré y col., (11).

Genotipificación

La determinación del genotipo del VHC se realizó mediante el análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región 5'NCR. Este método (RFLP) permitió distinguir adecuadamente los genotipos 1, 2 y 3 (11).

Secuenciamiento de la región NS5B

La amplificación de la región no estructural 5B (NS5B) y posterior secuenciamiento directo se realizó como se describió anteriormente por Chen y Weck, (12); a fin de confirmar los resultados obtenidos por la técnica de RFLP.

Cuantificación del ARN del VHC en el suero

El ARN del VHC en el suero se cuantificó con el equipo QT VHC NASBA (Organon Teknika, Baxtel, Países Bajos).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante SPSS para Windows y los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. El *Test de Student* se usó para comparar las variables continuas y *Chi-cuadrado* o prueba exacta de *Fisher* para la comparación de proporciones.

RESULTADOS

Las características de la población, edad, sexo, factores de riesgo, carga viral del VHC en suero y los genotipos de VHC fueron registradas (Tabla I). La prevalencia de ARN del VHC en la saliva fue del 21.6 % (8 / 37). Los resultados de la detección de VHC en saliva y su asociación con la vía de transmisión de VHC, la edad, coinfección con VIH, genotipo y carga viral del VHC se muestran en la Tabla II.

La distribución de los genotipos del VHC en los pacientes monoinfectados fue la siguiente: 48% (10/21) de genotipo 1, 43% (9 / 21) genotipo 2 y el 9% por el genotipo 3 (2 / 21). Para los pacientes co-infectados VIH/VHC, la distribución de genotipos fue de

76% (13/17), el 6% (1 / 17) y el 18% (3 / 17), respectivamente (Tabla I).

Los genotipos detectados en suero coincidieron con los detectados en saliva.

DISCUSION

La posibilidad de que la saliva sea una vía no parenteral de transmisión ha sido sugerida por una gran variedad de estudios. Ya en 1987, un estudio realizado por Abe y col., (13) describe la infección aguda en un chimpancé luego de la inoculación de saliva de un primate con hepatitis no A- no B. Estudios basados en la amplificación molecular de ARN de VHC en saliva reportan resultados variados con rangos de 0 (14) a 100% (15). Sin embargo, ninguno de estos estudios incluye datos que demuestran la infectividad del ARN del VHC detectado en saliva. En este sentido, Arrieta y col., (16) reportaron la detección de intermediario replicativo y antígeno core de VHC en el tejido de la glándula salival de 8 pacientes crónicamente infectados.

En nuestro estudio, demostramos la presencia de ARN- VHC en el 21,6% de las salivas estudiadas, mucho menor a la prevalencia hallada por Gonzalez y col., (17). Las discrepancias encontradas entre los estudios reportados podrían deberse a la ausencia de métodos estandarizados tanto para la toma de muestras como para los métodos de centrifugación, congelación y detección de este virus en saliva. Otra explicación posible podría darse en la presencia de sangre oculta y/o de células en las salivas de estudio. A pesar de que a VHC se lo ha encontrado en los leucocitos y las células epiteliales orales (16), las muestras de saliva de este estudio estaban libres de tales células. Las pruebas específicas para investigar sangre oculta no se realizaron en este trabajo, pero algunos autores (16,17) han demostrado que entre las personas infectadas con el VHC, la presencia de sangre en muestras de saliva no se correlaciona con la presencia de ARN del VHC en suero (16).

La asociación entre el nivel de ARN de VHC y la excreción en mucosa parece variar durante el curso de la infección. Según fue demostrado por varios autores el ARN es más frecuentemente hallado en saliva cuando la carga viral en suero es mayor (7,

-17-

8, 9). Así factores clínicos que están asociados a mayores cargas virales, tales como infección aguda o coinfección VIH/VHC pueden resultar en mayor frecuencia de detección de VHC en saliva.

En concordancia con Lins y col., (18) en nuestro estudio no se halló correlación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre la presencia de ARN del VHC vs. carga viral y coinfección con VIH. Sin embargo, un mayor porcentaje de detección en saliva se observó cuando la carga viral fue superior a 5 Log (Tabla II).

En cuanto a la detección de genotipos de VHC hallamos igual genotipo en las muestras de suero y saliva de un mismo paciente. Sin embargo, estudios más detallados del genoma viral (subtipos – cuaciespecies) se realizarán en un futuro a fin profundizar estos resultados. En este sentido, recientemente se ha demostrado que VHC posee replicación extrahepática – y varios reportes han demostrado variantes virales intratípicas dentro de los diferentes compartimentos corporales (19, 20, 21). Nuestros datos muestran que el ARN de VHC está presente en la saliva de individuos infectados con este virus, el mecanismo de excreción de VHC y el rol que cumple ésta en la actual transmisión de la infección a otros individuos aún no está claro. Múltiples factores contribuyen a la infectividad de un fluido biológico, incluyendo la presencia de partículas virales intactas, el título viral adecuado y la presencia de células blancas adecuadas en el área expuesta del individuo susceptible. Actualmente, los datos epidemiológicos no acompañan el concepto de que VHC es eficientemente transmitido mediante saliva. Sin embargo, el uso de cepillo de dientes y los tratamientos odontológicos han sido imputados como vehículos para la transmisión de VHC en varios estudios (22).

Si bien, nuestros resultados, juntamente con los hallazgos de otros autores sustentan la posibilidad de que VHC pueda ser transmitido por saliva en ciertas y determinadas circunstancias, los hallazgos deben ser interpretados con mucha precaución, para evitar una innecesaria preocupación en los individuos infectados por HCV.

Asimismo, los resultados deben ser tenidos

-18-

en consideración a fin de guardar las medidas de bioseguridad apropiadas en la atención médico-odontológica.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue subsidiado parcialmente por SECYT (Secretaría de Ciencias, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina) y SIP-UCC (Secretaría de Investigación y Posgrado- Universidad Católica de Córdoba).

REFERENCIAS

- 1- Center for Disease Control and Prevention. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Atlanta, MMWR;1998, 47 (No. RR-19).
- 2- Sherman K E. HCV and HIV: a tale of two viruses. *Rev Gastroenterol Disord* ;2004, 4: 48-54.
- 3- Ré V, Gallego S, Farías A, Barbás G, Kremer L, Díaz P, Contigiani M. Hepatitis C infection among HIV-infected subjects: prevalence, genotype characterization and risk factors. *Enf Infec Microbiol Clin*; 2008, 26: 423-425.
- 4- De Nishioka S A, Gyorkos T W, Joseph L, et al. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol*; 2003, 18: 441-449.
- 5- McMahon J M, Simm M, Milano D, Clatts M. Detection of hepatitis C virus in the nasal secretions of an intranasal drug-user. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; 2004, 3:6.
- 6- Terrault N. Sexual activity as a risk factor for Hepatitis C. *Hepatology*; 2002, 36: 99-105.
- 7- Eirea M, Dios PD, Hermida M, et al. Detection of HCV-RNA in saliva of HIV-HCV coinfecting patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 2005, 21:1011-1015.
- 8- Pastore L, Fiore JR, Tateo M, De Benedittis M, Petrucci M, Casalino C, Genchi C, Lo Muzio L, Angarano G, Serpico R. Detection of hepatitis C virus-RNA in saliva from chronically HCV-infected patients. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 2006. 19:217-224.
- 9- Wang CC, Morishima C, Chung M, Engelberg R, Krantz E, Krows M, Sullivan DG, Gretch DR, Corey L. High serum hepatitis C virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV

- infection. *J Infect Dis.*; 2006, 193:672-676.
- 10- Manavi M, Baghestain M, Watkins-Reidel T, et al. Detection of Hepatitis C Virus RNA in Normal Cervical Smears of HCV-Seropositive Patients. *Clin Inf Dis.*; 2002, 35:966-973.
- 11- Ré V, Lampe E, Yoshida CF, de Oliveira JM, Lewis-Ximénez L, Spinsanti L, Elbarcha O, Contigiani M. Hepatitis C virus genotypes in Cordoba, Argentina. Unexpected high prevalence of genotype 2. *Medicina*; 2003, 63:205-210.
- 12- Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol.*; 2002, 40:3127-3134.
- 13- Abe K, Kurata T, Shikata T, Sugitani M, Oda T. Experimental transmission of non-A, non-B hepatitis by saliva. *J Infect Dis.*; 1987, 155:1078-1079.
- 14- Fried MW, Shindo M, Fong TL, Fox PC, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Absence of hepatitis C viral RNA from saliva and semen of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*; 1992, 102:1306-1308.
- 15- Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, Yamamoto N. Hepatitis C virus propagates in salivary glands. *J Infect Dis.*; 1992, 165:973-974.
- 16- Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Macías DM, Carreño V. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol*; 2001, 158:259-264.
- 17- Goncalves PL, Cunha CB, Busek SC, Olivera GC, Rivero-Rodriguez R, Pereira FE. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis.*; 2005, 9:28-34.
- 18- Lins L, Almeida H, Vitvisk L, Carmo T, Paraná R, Reis MG. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol.*; 2005, 77:216-220.
- 19- Minosse C, Calcaterra S, Abbate I, Selli M, Zaniratti MS, Capobianchi R. Possible compartmentalization of hepatitis C viral replication in the genital tract of HIV-1-coinfected women. *J Infect Dis.*; 2006, 194:1529-1536.
- 20- Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, Samuel D, Féray C. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.*; 2005, 79:6349-6357.
- 21- Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology*; 2006, 44:15-22.
- 22- Stein JA, Nyamathi A. Correlates of hepatitis C virus infection in homeless men: a latent variable approach. *Drug Alcohol Depend.*; 2004, 75:89-95.

Tabla I. Características de la población de estudio y determinación del genotipo en 37 pacientes infectados con VHC de Córdoba, Argentina.

Variables	HCV mono infectados	HCV/HIV co-infectados
Edad (promedio)	45	38
Sexo		
Masculinos	10	11
Femeninos	11	5
Total	21	16
Riesgo Parental*		
Transfusión	6	2
UDEV	3	13
Cirugía	13	5
Riesgo Incierto**	6	2
VHC Genotipos		
Genotipo 1	10	13
Genotipo 2	9	1
Genotipo 3	2	2
Carga viral VHC (promedio) log	4,6	5,6
Tratamiento Antirretroviral	--	No

* En algunos casos se observó más de un riesgo por paciente

** Historia de atención odontológica, medicación con inyectables, transmisión familiar (compartir hojas de afeitar, cepillos de dientes y peines), tatuaje, múltiples parejas sexuales, hombres que tienen sexo hombres (HSH) o diferentes hábitos sexuales.

Tabla II. Detección de ARN del VHC en saliva de 37 pacientes infectados con VHC de Córdoba, Argentina

Variables*	Saliva	
	N	%
Genotipos		
1	5	63
2	2	25
3	1	12
Edad		
> 40	5	63
< 40	3	37
UDEV		
Si	5	63
No	3	37
VHC Carga viral		
> 5 log	7	88
< 5 log	1	12
VH co-infección		
Si	5	63
No	3	37
Cirugía		
Si	3	37
No	5	63
Transfusión		
Si	3	37
No	5	63
Riesgo Incierto		
Si	2	25
No	6	75

* En todos los casos $p > 0$,