



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação da acurácia do protótipo de um Biosensor na identificação simultânea de anticorpos específicos contra os vírus C da Hepatite e da Imunodeficiência Humana

Victor A. C. Castro-Lima

**Salvador, Bahia
Março, 2013**

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Castro-Lima, Victor Augusto Camarinha de
C355 Avaliação da acurácia do protótipo de um biosensor na identificação simultânea de anticorpos específicos contra os vírus C da hepatite e da imunodeficiência humana / Victor Augusto Camarinha de Castro Lima. Salvador: 2013.
viii; 37 p. :il. [tab].

Inclui anexos.
Orientador: Prof. Dr. Roberto Badaró.
Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.

1. Sorologia. 2. HIV (vírus). 3. Hepatite C . I. Badaró, Roberto. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU - . 616.9-097



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação da acurácia do protótipo de um Biosensor na identificação simultânea de anticorpos específicos contra os vírus C da Hepatite e da Imunodeficiência Humana

Victor A. C. Castro-Lima

Professor orientador: **Roberto Badaró**

Orientadora tutora: **Zuinara Maia**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2012.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador, Bahia

Março, 2013

Monografia: *Avaliação da acurácia do protótipo de um Biosensor na identificação simultânea de anticorpos específicos contra os vírus C da Hepatite e da Imunodeficiência Humana*, de **Victor A. C. Castro-Lima**.

Professor orientador: **Roberto Badaró**

Orientadora tutora: **Zuinara Maia**

COMISSÃO REVISORA

- **Roberto Badaró** (Presidente), Professor Adjunto vinculado ao Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

- **Luciana Rodrigues Silva**, Professora Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

- **Diana Brasil Pedral Sampaio**, Preceptora do Programa de Residência Médica em Infectologia, vinculado à Comissão de Residência Médica do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

- **Ana Luisa Vilas-Bôas**, Pós-Graduanda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: 

Membro suplente

Marco Antônio Vasconcelos Rêgo, Professor Adjunto vinculado ao Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no IV Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2013.

*Se não houver frutos, valeu a beleza das
flores... Se não houver flores, valeu a sombra
das folhas... Se não houver folhas, valeu a
intenção da semente.*

(extraído de um poema de autor anônimo
relatado no livro “Diretas Já!”, de **Henrique
de Sousa Filho**, conhecido pelo pseudônimo
Henfil)

Dedico este trabalho aos meus avôs **Josué** e **Mário Augusto** (*in memorian*), pelos exemplos; às minhas avós **Maria do Carmo** e **Denascy**, pelo amor incondicional; e a tia **Ana Rosa** (*in memorian*), pela perseverança.

Equipe

- Victor Augusto Camarinha de Castro-Lima, Estudante de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia (FMB-UFBA).
- Zuinara Pereira Gusmão Maia, Mestre em Medicina e Saúde, UFBA.
- Monique Lírio, Estudante de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
- Vivian Moana de Araújo Vianna, Estudante de Medicina da FMB-UFBA.
- Roberto José da Silva Badaró, PhD em Imunologia e Doenças Infecciosas e professor-adjunto da FMB-UFBA.

Instituições Participantes

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO

- Antiviral Research Center

Informações para contato:

Victor A. C. Castro-Lima

Rua Augusto Viana, s/n, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Laboratório de Doenças Tropicais, 6º andar B, Canela, Salvador, Bahia, Brasil – CEP 40110-060

e-mail: v.accl@hotmail.com

Agradecimentos

- Aos meus amados pais, **Cristina** e **Ângelo**, que, pelas oportunidades, incentivo, amor, carinho e dedicação, são os grandes responsáveis por eu conseguir chegar até aqui;
- Ao mestre **Dr. Roberto Badaró**, pelas ideias, ensinamentos, oportunidades e por me acolher de forma tão paternal em seu grupo de pesquisa;
- A **Zuinara Maia**, pela atenção, paciência e imensurável ajuda na realização deste trabalho;
- As colegas, **Vivian Vianna** e **Monique Lírio**, pelo apoio fundamental na coleta de dados;
- A **Maria Nakatani**, pelas infindáveis ajudas no laboratório;
- A toda equipe de médicos, enfermeiros e funcionários do Ambulatório de Hepatites, Unidade Docente Assistencial de Infectologia, Laboratório Tropical, Laboratório Central e Laboratório Retrovírus do C-HUPES, pelos mais diversos auxílios, em especial: **Dr. André Lyra**, **Dra. Louriane**, **Dona Lúcia**, **Maurina** e **Marcos Abrahão**;
- Aos **pacientes** que, de forma anônima e voluntária, cederam, humilde e gentilmente, pedaços de si mesmos, sem os quais este estudo, além de inviável, não teria sentido algum.

Sumário

I. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	3
II. RESUMO	4
III. OBJETIVOS	5
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
IV.1. Hepatite C	6
IV.1.1. Introdução	6
IV.1.2. Agente etiológico da Hepatite C	7
IV.1.3. Epidemiologia da Hepatite C	8
IV.2. Co-infecção HCV/HIV	10
IV.2.1. Introdução	10
IV.2.2. Diagnóstico Sorológico da infecção pelo HCV e co-infecção HCV/HIV	11
IV.3. Biosensores e biochips	13
IV.3.1. Histórico.....	13
IV.3.2. A tecnologia	14
IV.3.3. O Biosensor da mBio Diagnostics®	15
IV.3.4 Perspectivas Futuras.....	17
V. METODOLOGIA	19
V.1 Delineamento	19
V.2 Seleção da amostra	19
V.3 Definição do status de infecção ou não-infecção	19
V.4 Sorologia pelo ELISA	20
V.5 Sorologia pelo Biosensor mBio®.....	20
V.6 Análise Estatística	20
V.7 Questões Éticas	21
VI. RESULTADOS.....	22
VI.1. Perfil da amostra	22
VI.2. Acurácia dos métodos	22
VII. DISCUSSÃO	25
VIII. CONCLUSÕES.....	27
IX. SUMMARY	28
X. ANEXOS.....	29

Anexo 1: Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	29
Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	31
Anexo 3: Questionário	33
REFERÊNCIAS	34

I. ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01: Prevalência estimada da infecção pelo HCV por região	9
Figura 02: Representação esquemática do biosensor	15
Figura 03: O biosensor mBio® com os cartuchos	16
Figura 04: Representação esquemática e exemplo da organização da matriz dos arranjos do biosensor mBio®.....	17
Figura 05: Novo aparelho mBio® SnapEsi e esquema ilustrativo de cartucho com anticorpos e antígenos	18
Tabela 01: Perfil da população estudada	23
Tabela 02: Desempenho do biosensor comparado ao ELISA em indivíduos infectados pelo HCV ou HCV/HIV	24

II. RESUMO

AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO PROTÓTIPO DE UM BIOSENSOR NA IDENTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA OS VÍRUS C DA HEPATITE E DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

Os Biosensores se constituem em uma nova perspectiva no diagnóstico de diversas doenças infecto-parasitárias, tendo em vista que possuem uma série de vantagens, como facilidade de manuseio, portabilidade, rapidez dos resultados e capacidade de detectar diferentes infecções de forma simultânea. Neste estudo piloto, um protótipo de Biosensor foi avaliado para detectar anticorpos anti-HCV e anti-HIV em indivíduos acompanhados no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Bahia, Brasil. O principal objetivo do estudo foi avaliar a acurácia deste novo método diagnóstico. Realizou-se sorologia com o Biosensor mBio® e método ELISA, usado de rotina no laboratório do hospital, para detecção de anticorpos anti-HIV e anti-HCV em 54 indivíduos (n=36 indivíduos com HCV, n=8 indivíduos com HIV/HCV, e 10 indivíduos sem infecção). Os achados laboratoriais foram comparados aos achados clínicos para calcular medidas de acurácia e concordância entre os testes. A técnica do biosensor demonstrou uma maior sensibilidade e valor preditivo negativo na detecção da infecção pelo HCV, co-infecção HCV/HIV e na ausência de infecção, quando comparado ao método ELISA convencional. Além disso, a especificidade e valor preditivo positivo de ambos os métodos foram equivalentes e iguais a 100%. O biosensor estudado demonstrou uma boa acurácia, quando comparado ao método ELISA usado de rotina, de forma que este novo método pode ser uma boa perspectiva diagnóstica. A possibilidade de detecção de co-infecções simultaneamente em uma mesma amostra, a velocidade de detecção dos resultados, a facilidade de manuseio e de transporte constituem importantes vantagens do novo método na avaliação e conduta de pacientes infectados pelo HIV ou HCV.

Palavras-chave: biosensor, coinfection, HIV, hepatitis C.

III. OBJETIVOS

PRINCIPAL

Avaliar a acurácia de um protótipo de biosensor e cartuchos, uma nova ferramenta diagnóstica, desenvolvidos pelo mBio Diagnostics, Inc., e sua concordância com a reação imunoenzimática (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos contra o HCV no sangue de indivíduos infectados e co-infectados por HIV na cidade do Salvador, Bahia, Brasil.

SECUNDÁRIOS

1. avaliar a capacidade do método em detectar diferentes infecções (HCV e HIV) de forma simultânea;
2. estudar alguns dos aspectos do perfil epidemiológico dos participantes do estudo.

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

IV.1. Hepatite C

IV.1.1. Introdução

A hepatite C é uma doença infecto-contagiosa causada pelo vírus C da hepatite (HCV) e representa um importante problema de saúde pública no mundo (1–4). É uma das principais causas de doença crônica parenquimatosa do fígado (DCPF) e possui um amplo espectro clínico, que perpassa formas clínicas agudas, geralmente assintomáticas ou com sintomatologia branda, até formas crônicas, que podem causar lesões hepáticas mais severas, culminando com a cirrose e a insuficiência hepática (3,4). Além disso, os portadores do HCV possuem um risco mais elevado de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (3,4).

Uma das principais características do HCV é o fato de que a maioria dos indivíduos contaminados desenvolve uma infecção crônica após a exposição viral (4). Alguns estudos mostram que entre 80% e 100% de indivíduos apresentam uma persistência viral, demonstrada pela detecção de ácido ribonucleico (RNA) do patógeno no sangue do paciente, e entre 60% e 80% de indivíduos mantêm os níveis de transaminases elevados após um episódio agudo de hepatite C, informações que corroboram e ilustram essa tendência à cronicidade desta infecção (3,5). O mecanismo responsável por tal tendência permanece desconhecido, no entanto a heterogeneidade genética do HCV pode ser uma das explicações, tendo em vista que, devido a esta característica, o vírus pode escapar do reconhecimento imune do hospedeiro com maior facilidade (6,7).

A história natural da hepatite C é difícil de ser estabelecida e elucidada, já que se trata de uma doença de curso muito prolongado (8). A sua progressão pode depender de vários fatores relacionados tanto ao patógeno quanto ao hospedeiro. Alguns desses fatores, já sugeridos em estudos são: idade, sexo, etnia, co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou com o vírus da hepatite B (HBV), outras doenças hepáticas associadas, como a esteatose hepática, consumo excessivo de álcool, índice de massa corpórea (IMC) e co-infecção com diferentes genótipos do HCV (9,10). Alguns

estudos demonstram que a cirrose irá ocorrer em algum momento da doença em mais de 50% dos portadores de hepatite C crônica. Além disso, estima-se que 27% de todos os diagnósticos de cirrose ocorrem em decorrência desta infecção (1,8). A cirrose é um pré-requisito para grande parte das complicações relacionadas à insuficiência hepática, que se constituem como as principais causas de morbi-mortalidade da hepatite C, não obstante nem todo paciente que evolui para cirrose desenvolve tais complicações (8). Em relação às neoplasias, estima-se que o risco de um portador crônico do HCV desenvolver um carcinoma hepatocelular varia entre 0% e 3% ao ano em alguns estudos e por volta de 25% de todos os carcinomas hepatocelulares diagnosticados ocorrem relacionados a esta infecção (1). Além disso, a DCPF secundária à infecção pelo HCV é uma das principais indicações para o transplante hepático nos Estados Unidos da América (EUA) (4).

A via de transmissão do HCV é parenteral. A mais importante forma de transmissão é o contato com objetos perfuro-cortantes contaminados, como pode ocorrer com o compartilhamento de seringas no uso de drogas intravenosas, com o acidente com algum desses objetos ou com o contato com agulha durante a realização de uma tatuagem ou o implante de um piercing (3). Outras formas de transmissão já relatadas são: relações sexuais sem o uso de preservativo, transfusão de sangue, transplante de órgãos, hemodiálise e transmissão vertical (3,11).

IV.1.2. Agente etiológico da Hepatite C

O HCV, agente etiológico da hepatite C, foi identificado em 1989, quando o seu genoma foi clonado. O patógeno ganhou esta denominação, por se tratar de um vírus não-A e não-B, os únicos vírus causadores de hepatite até então conhecidos, que causava lesão ao tecido hepático (12). Trata-se de um vírus envelopado, não-citopático e hepatotrópico, pertencente ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae*, que tem como material genético uma fita simples de RNA de polaridade positiva, constituída por aproximadamente 9.500 nucleotídeos (13).

A heterogeneidade genética é uma das mais proeminentes características do HCV e é um importante fator para o diagnóstico e patogênese da infecção, além de exercer influência na resposta ao tratamento com antivirais, constituindo-se um importante mecanismo de defesa do patógeno (7). Já foram identificados seis diferentes

genótipos do HCV (1-6), que diferem em aproximadamente 30-35% na sequência nucleotídica, e cuja evolução provavelmente teve influência de diversos fatores como: seleção imune, eficiência da replicação e migração populacional (3). Os genótipos exibem uma distribuição geográfica característica: o genótipo 1 é o mais encontrado na Europa e América do Norte e o genótipo 2 ocorre com maior frequência no Japão e na China (3). No Brasil e na América Latina, o genótipo 1 é o mais frequente, seguido pelo genótipo 3 (3,14,15). Para cada genótipo podem ser identificados também diferentes subtipos (a, b, c, etc.) (3). Outro importante exemplo da heterogeneidade do HCV é a possibilidade da coexistência de diferentes genomas do mesmo vírus em um mesmo indivíduo infectado, que ocorre em decorrência do fenômeno da pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro, levando à formação das denominadas *quasispecies* (3).

IV.1.3. Epidemiologia da Hepatite C

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 150 milhões de indivíduos estão cronicamente infectados com o HCV no mundo, o que representa uma prevalência de aproximadamente 2,5% da população mundial (1,2). Dados da OMS também apontam que entre 3 e 4 milhões de pessoas contraem a infecção anualmente e mais de 350.000 morrem de doenças relacionadas à injúria hepática causada pelo HCV a cada ano em todo o mundo (2,3). No entanto, existe uma grande variação geográfica da prevalência da infecção, que depende principalmente do grau de desenvolvimento da nação estudada (Figura 1) (2,16). Por exemplo, altas prevalências podem ser encontradas em países da África e da Ásia, como Egito, Paquistão e China, que apresentam prevalências estimadas em, respectivamente, 15%, 4,8% e 3,2% (2,16). Em contrapartida, países com maior grau de desenvolvimento e industrialização, como é o caso dos países do oeste e norte da Europa, Austrália e EUA, possuem menor prevalência (16,17). De acordo com o *Centers for Disease Control* dos EUA, o número de casos incidentes de hepatite C aguda neste país sofreu uma redução de aproximadamente 230.000 casos/ano nos anos 1980 para cerca de 17.000 casos/ano em 2010, tendo tido neste ano uma incidência de 0,3 casos para cada 100.000 habitantes (18). Algumas explicações para essa significativa redução são a diminuição do número de casos em usuários de drogas injetáveis, por mudanças na prática de utilização das seringas, e a redução da transmissão por meio de transfusão sanguínea através,

principalmente, da difusão da prática do *screening* sorológico das bolsas de hemoconcentrados nos bancos de sangue a partir de meados dos anos 1980 (17).

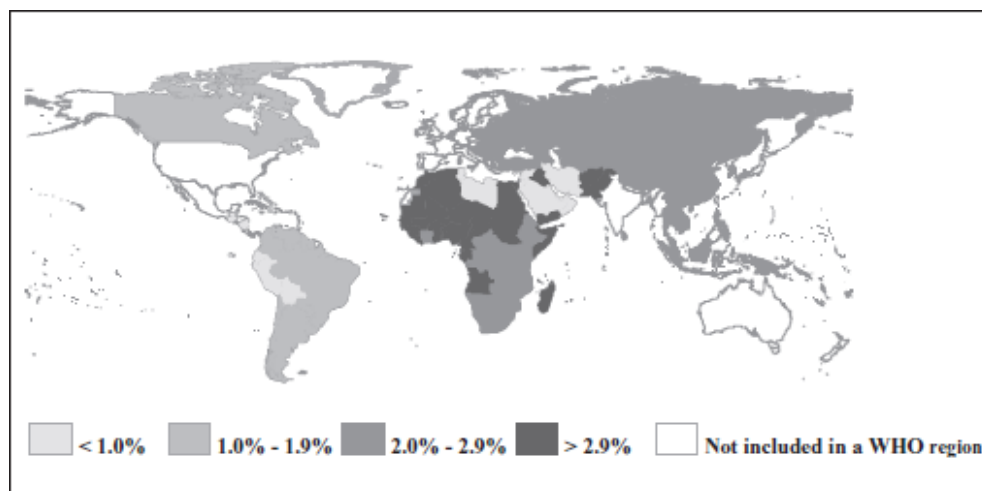


Figura 1: Prevalência estimada da infecção pelo HCV por região. Fonte: Burden G. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *Journal of clinical pharmacology*. 2004 Jan;44(1):20–9

A prevalência de anticorpos anti-HCV na população americana, segundo a *National and Nutrition Examination Survey* em 2006, foi de aproximadamente 1,6% (17). A maior prevalência foi encontrada em indivíduos do sexo masculino, nascidos entre 1945 e 1964, usuários de drogas injetáveis, afroamericanos ou descendentes de mexicanos, com uma baixa renda familiar e com uma história de mais de 20 parceiros sexuais em toda a vida (17). Em um estudo realizado nos EUA, os principais fatores de risco para infecção pelo HCV foram: uso de drogas intravenosas, transfusão sanguínea, possuir um usuário de droga intravenosa como parceiro sexual, acidentes com objetos perfuro-cortantes contaminados e implantação de *piercing* em qualquer parte do corpo (19).

No Brasil, aproximadamente 70.000 casos de hepatite C crônica foram confirmados entre os anos de 1999 e 2010 (20). A taxa média de detecção foi de 4,5 casos por 100.000 habitantes, em 2010 (20). A prevalência estimada de exposição ao HCV em populações entre 10 e 69 anos, em um estudo de 2010, variou entre 0,7% e 2,1% (20). Entre as hepatites virais, a hepatite C foi a que apresentou maior mortalidade no país na última década, sendo 14.900 mortes diretamente relacionadas à infecção pelo HCV e 27.231 mortes que tiveram a hepatite C como fator contribuinte para tal desfecho, entre os anos 2000 e 2010 (20). Além disso, os coeficientes de mortalidade foram crescentes desde o ano 2000, chegando a um óbito para cada 100.000 habitantes em 2007 e permanecendo neste patamar até 2010 (20). Entre as diversas regiões do

Brasil, sul e sudeste foram as que apresentaram maiores taxas de detecção da infecção, sendo 7,2 e 6,8 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, e maiores taxas de mortalidade, com 1,6 e 1,3 óbitos por 100.000 habitantes, em 2010 (20).

IV.2. Co-infecção HCV/HIV

IV.2.1. Introdução

Estima-se que, aproximadamente, 38 milhões de pessoas estão infectadas com o HIV e entre 150 e 170 milhões são portadoras do HCV em todo o mundo (21). Existe uma interseção entre essas duas infecções que possui importantes implicações médicas e epidemiológicas, tendo em vista que, aproximadamente, 25% a 30% de todos os pacientes infectados com o HIV são também portadores do HCV em todo o mundo (21). Existem evidências de que há um maior risco de transmissão do HCV em indivíduos infectados com o HIV em homens que fazem sexo com homens, em pessoas que realizam sexo anal desprotegido, que possuem alguma doença sexualmente transmissível (DST) e em heterossexuais com os fatores de risco clássicos para a aquisição do HCV (22).

O HCV e o HIV compartilham algumas características biológicas, como uma alta taxa de replicação viral e uma maior propensão do material genético ao desenvolvimento de mutações (23). Pacientes que possuem infecção crônica pelo HIV ou HCV costumam ter uma carga viral relativamente constante com o controle da doença, no entanto, no curso de uma infecção pelo HIV em um indivíduo portador da hepatite C, a carga viral do HCV, evidenciada pelos níveis de RNA deste vírus, costuma se elevar (23). Além disso, esta mesma viremia é inversamente proporcional à contagem de células T CD 4 (23). Pacientes que exibem infecção concomitante do HCV e do HIV evoluem para a cirrose com maior rapidez do que aqueles infectados exclusivamente com o HCV e possuem um risco maior de morte por DCPF em estágio final (23). Há resultados conflitantes acerca dos efeitos deletérios do HCV no curso da infecção pelo HIV. Não obstante, há evidências de que uma alta carga viral do HCV está associada a um maior risco de evolução para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (24). Outro fator que exerce influência sobre a infecção é o genótipo do HCV: o genótipo 1 parece ter associação com maior carga viral do vírus da hepatite, menores

níveis de linfócitos T CD4, e a uma maior mortalidade associada à SIDA, comparado com outros genótipos (23,25).

Devido a esta estreita relação entre as duas infecções e pelo fato de ambas possuírem alguns fatores de risco e modos de transmissão em comum, é aconselhável que todo paciente infectado pelo HIV faça uma avaliação para o HCV (23).

IV.2.2. Diagnóstico Sorológico da infecção pelo HCV e co-infecção HCV/HIV

Os testes para diagnosticar a infecção pelo HCV podem ser divididos em duas categorias principais: testes sorológicos, que objetivam a detecção de anticorpos anti-HCV e testes moleculares, que buscam detectar ou quantificar o RNA viral (26). Outros exames inespecíficos possuem papel fundamental no diagnóstico, manejo e avaliação da resposta terapêutica a esta infecção, como, por exemplo, níveis de aminotransferases, marcadores de função hepática, como albumina e tempo de protrombina, exames de imagem do fígado, testes genotípicos, biópsia hepática, entre outros (26). Na prática clínica, costuma-se primeiro utilizar exames para a detecção de anticorpos anti-HCV para então realizar os testes que detectam o RNA viral, objetivando-se, com estes, documentar a viremia e confirmar a infecção (26).

Os testes diagnósticos mais utilizados para a detecção de anticorpos anti-HCV no sangue de indivíduos são os ensaios imunoenzimáticos (EIE) ou *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (26). O teste com ELISA possui uma série de vantagens, como facilidade do uso por pessoas treinadas, pouca variabilidade de resultados e um custo relativamente baixo (26). Os anticorpos detectados pelo ELISA geralmente são os direcionados contra os antígenos do núcleo (C22) e das regiões não estruturais 3 (C33) e 4 (C100) (27). Em estudos que avaliaram a acurácia de alguns destes ensaios em populações de alta prevalência da infecção pelo HCV, observou-se sensibilidade maior que 95% e valor preditivo positivo entre 88% e 95% nos diferentes *kits* estudados (27). Estes métodos também evidenciaram uma média de detecção da soroconversão de dez semanas, em estudos que envolviam indivíduos expostos à transfusão sanguínea (27). Aparelhos que utilizam tecnologias mais recentes do ELISA, como os de terceira e quarta geração, são capazes de detectar outro anticorpo contra um antígeno da região não estrutural (NS5) (28). Os estudos que já foram realizados com estes novos aparelhos mostraram que eles possuem alta sensibilidade e especificidade em

populações com alta prevalência da infecção pelo HCV e são capazes de detectar os anticorpos mais precocemente que os de gerações anteriores (28).

Existem algumas situações em que pode se encontrar um resultado negativo para a detecção de anticorpos anti-HCV em um indivíduo infectado (falso-negativo) (26). Nesse contexto, as situações mais importantes são: infecção aguda pelo HCV, quando o organismo do indivíduo ainda não produziu os anticorpos a serem detectados, e estados de imunossupressão, como a infecção pelo HIV (26). Em situações como essas os exames confirmatórios desempenham um papel fundamental.

Os exames confirmatórios auxiliam os profissionais de saúde na interpretação e manejo de resultados positivos de detecção do anti-HCV, e na avaliação de possíveis resultados falso-positivos, particularmente em populações com baixa prevalência do vírus e com poucos fatores de risco (26). Os testes mais usados com esta finalidade são aqueles que avaliam o RNA do HCV, podendo estes ser qualitativos ou quantitativos (26). Os primeiros apenas informam se existe ou não material genético viral, já os quantitativos traduzem a quantidade de ácido nucléico do vírus presente no material estudado (26,27). Esses exames são de fundamental importância para o manejo do paciente infectado cronicamente com o HCV. As principais técnicas utilizadas para a detecção do RNA viral são a *polymerase chain reaction* (PCR) e a *transcription-mediated amplification* (TMA) (26).

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV é estabelecido através de um dos seguintes princípios: detecção de anticorpos contra o vírus, detecção de antígenos virais, detecção de material genético viral ou cultura do HIV(29). Desses, o mais utilizado é a detecção de anticorpos anti-HIV (29). Os testes sorológicos para a infecção pelo HIV são baseados na detecção de imunoglobulina G (IgG) direcionada contra antígenos virais, como o p24 (proteína do nucleocapsídeo), gp 120 e gp 41 (proteínas do envelope) (29). O método padrão para a detecção dos anticorpos é o ELISA (29). Os anticorpos IgG costumam aparecer entre 6 e 12 semanas após a exposição ao vírus e geralmente persistem por toda a vida (30). Os resultados positivos precisam ser confirmados com outros métodos, como o *western blot* (29).

A acurácia dos testes sorológicos com o método ELISA vem aumentando com o surgimento de novas gerações de testes, desde 1985, quando esta técnica começou a estar disponível para o diagnóstico da infecção pelo HIV (29,30). Concomitantemente, a janela imunológica para a detecção dos anticorpos vem diminuindo: os ensaios da

terceira geração são capazes de fazer a detecção com três a sete semanas após a exposição (29,30). Outra forma de determinar a infecção pelo HIV é através dos testes rápidos, que oferecem um menor custo e resultados rápidos, porém apresentam uma sensibilidade menor quando comparados aos testes padrão (29,30). Existem diversos *kits* disponíveis no mercado, tanto para os testes rápidos como para o método ELISA (29,30).

IV.3. Biosensores e biochips

IV.3.1. Histórico

A evolução tecnológica no campo da imunologia no século XX, especialmente com a elucidação da estrutura dos anticorpos, permitiu que vários testes sorológicos fossem utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas (31). Alguns dos métodos que surgiram foram o teste da imunofluorescência e técnicas de marcação com radioimunoensaio, que trouxeram mais especificidade na detecção de antígenos e anticorpos circulantes (31). Posteriormente, foi desenvolvida a mais utilizada tecnologia para detecção de antígenos e/ou anticorpos, o método ELISA, que mudou o paradigma dos testes diagnósticos vigentes em direção aos ensaios imunoenzimáticos (31,32). Até hoje, inúmeros testes utilizam essa técnica para o diagnóstico de diversas condições e doenças (31).

Foi apenas no final do século XX e início do XXI, com a evolução tecnológica em áreas como a bioquímica e a bioinformática, que foi possível o desenvolvimento dos *chips* biológicos (31). Os biochips representam uma miniaturização de arranjos de amostras individuais capazes de permitir a identificação de substâncias presentes em um material de origem biológica ou não (33). Inicialmente eles foram desenvolvidos para a detecção de toxinas e venenos usados no bioterrorismo, mas posteriormente sua aplicabilidade foi ampliada para situações como: monitoramento ambiental de poluentes, aplicações biomédicas, controle em indústrias químicas, de bebidas e de alimentos (33).

Em 1956, Leland Clark desenvolveu um sensor capaz de detectar gás oxigênio, que serviu de base para outro aparelho desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons para a detecção de moléculas de glicose (31). Foi quando surgiu o conceito de um sensor capaz

de detectar moléculas biológicas, o biosensor (31). A partir de então, vários outros dispositivos foram desenvolvidos para a detecção de diferentes biomoléculas (31). Com os avanços tecnológicos que culminaram com o desenvolvimento concomitante dos biochips, foi possível a fusão dessas duas tecnologias no final do século XX, permitindo o advento de uma nova perspectiva de testes diagnósticos (31).

Na atualidade, os biosensores possuem diversas aplicações no campo da biomedicina (31,34). Algumas das utilidades clínicas já descritas na literatura são: detecção de marcadores oncológicos, anticorpos autoimunes, marcadores de lesão miocárdica, glicemia, análise do DNA, genes específicos e mutações, e no desenvolvimento de drogas (31,34). Na área das doenças infecciosas, já existem estudos para o diagnóstico de infecções como dengue e hepatite B utilizando esses aparelhos (31,34). Diferentes biosensores estão disponíveis em números cada vez maiores para comercialização e dispõem de uma série de vantagens, como facilidade no manuseio, prescindindo de conhecimento prévio específico, rapidez de obtenção dos resultados, possibilidade de detecção simultânea de diferentes reações e facilidade no transporte, podendo servir como alternativa em locais que não disponham de muitos recursos diagnósticos (31,34).

IV.3.2. A tecnologia

De uma forma geral, já que não é o propósito deste trabalho esgotar todas as peculiaridades desta tecnologia, o princípio biológico básico para o desenvolvimento do biochip foi alicerçado no emprego da fase sólida do método ELISA e da bioinformática (31,33). Cada biochip, constituído pelos microarranjos, possui de centenas a milhares de gotas de gel, associadas a biomoléculas, como anticorpos, antígenos, e filamento de ácido nucléico, tornando-as específicas para o reconhecimento molecular (31,33,35,36). O posicionamento das gotas é conhecido previamente, de forma que, quando uma amostra reage, a posição da reação pode ser detectada, identificando-a (31,33,35,36). A amostra a ser testada é aplicada ao biochip, que é então colocado em um biosensor, que funciona como um leitor e escaneador da reação que irá ou não ocorrer (31,33,35,36). O biosensor detecta a ocorrência da reação utilizando tecnologia de iluminação lateral a laser e o sinal produzido é então conduzido por um transdutor e um processador de sinal (31,33,35,36). Por fim, os sinais produzidos são interpretados por meio de algoritmos

automatizados, permitindo o reconhecimento e análise dos resultados pelo observador (Figura 2) (31,33,35,36).

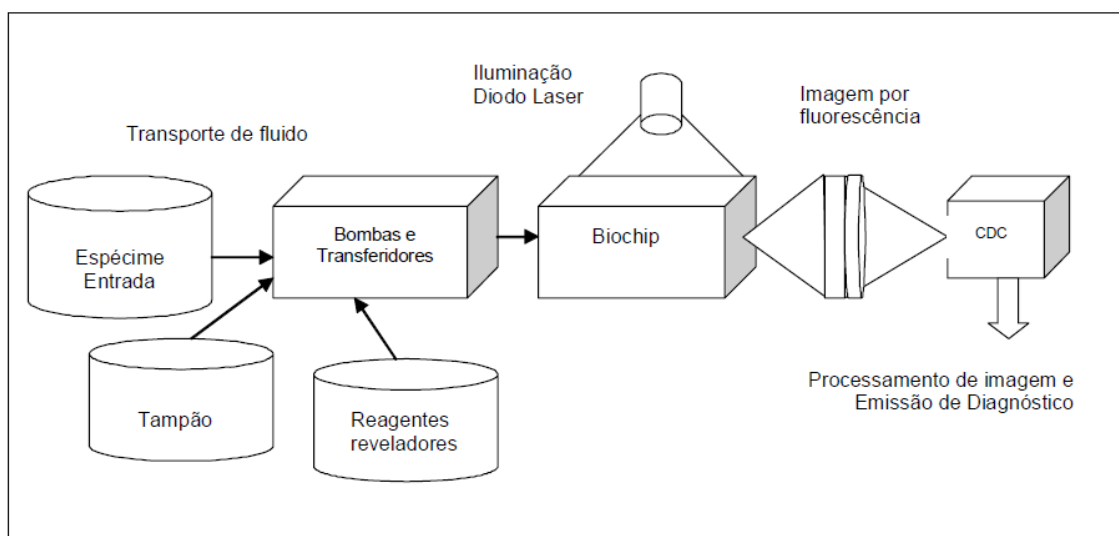


Figura 2: Representação esquemática do biossensor. Fonte: Knop LB. Estudo piloto para utilização da nova tecnologia de biossensor no diagnóstico das doenças infecciosas. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; 2007.

IV.3.3. O Biossensor da mBio Diagnostics®

A empresa mBio Diagnostics®, com sede nos EUA, desenvolveu um biossensor para o diagnóstico de infecção pelo HIV-1, HCV e *Treponema pallidum* (37). O objetivo era prover um aparelho de fácil manuseio e transporte, de baixo custo, com boa acurácia diagnóstica e que permitisse o diagnóstico simultâneo de co-infecções (37).

O sistema funciona da seguinte maneira: cada cartucho contendo os reagentes biológicos e a amostra de sangue total ou soro, onde ocorrem reações de imunensaio fluorescente, é lido individualmente pelo biossensor, que atua como um dispositivo periférico do tipo *Universal Serial Bus* (USB) conectado a um computador *laptop* (Figura 3) (37). Os resultados das amostras, após serem processados e transformados em imagem através de um direcionador de ondas eletromagnéticas, são compilados como documentos digitais e são apresentados no monitor do computador através de um *software* específico (37). Os reagentes biológicos utilizados nos cartuchos de leitura pelo biossensor são: glicoproteína 41 (gp41) do envelope e o antígeno p24 do capsídeo para o HIV-1; proteínas do *Treponema pallidum* Tp47 e Tp17; e proteína recombinante

do núcleo (proteína de fusão p22), *full-length* NS3 (c33c), mosaico recombinante que decodifica as regiões imunodominantes NS4 e um recombinante que contém regiões imunodominantes do nucleocapsídeo, NS3, NS4 e NS5, para o HCV (37).

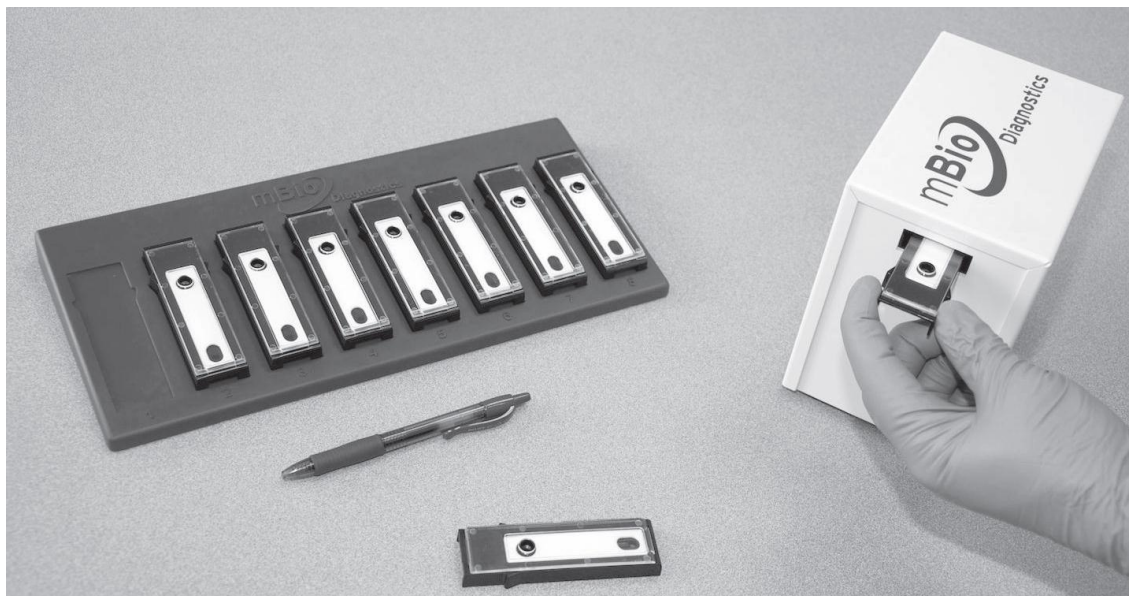
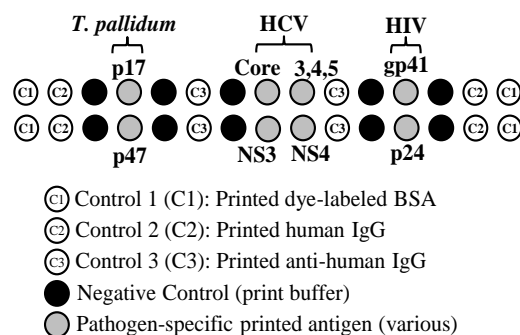
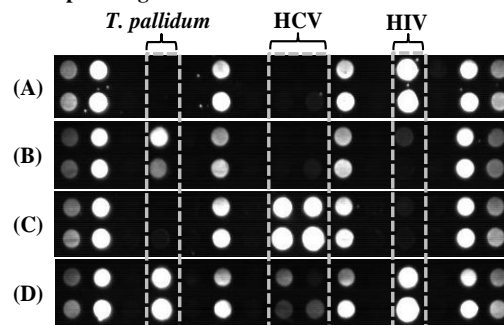


Figura 3: O biosensor mBio® com os cartuchos. Fonte: Lochhead MJ, Todorof K, Delaney M, Ives JT, Greef C, Moll K, et al. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Oct;49(10):3584–90.

Os resultados preliminares sobre este sistema foram obtidos do estudo de colaboração com a Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD), liderada pelo Dr. Robert Schooley. As amostras de plasma proveniente de uma coorte de indivíduos infectados pelo HIV e co-infectados com HCV e/ou sífilis foram coletados no Antiviral Research Center (AVRC) na UCSD, no âmbito de um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da instituição. As amostras AVRC foram complementadas por um conjunto de fontes comerciais de amostras positivas e controles negativos. Um total de 251 amostras clínicas foi analisado como parte deste estudo. Os cartuchos de HIV-1/HCV/Syphilis (*T. pallidum*) mBio® no ensaio utilizados no estudo revelam a reatividade do anticorpo contra um painel de antígenos para todos os três patógenos. A Figura 4 fornece o layout da matriz e representa os resultados preliminares sobre o sistema. As amostras AVRC foram complementadas por um conjunto de fontes de amostras positivas e controles negativos (37).



Example Images:



Background-subtracted, normalized spot intensities.								
ID	HIV-1		<i>T. pallidum</i>		Hepatitis C Virus (HCV)			
	gp41	p24	p17	p47	Core	NS3	NS4	Multi
(A)	3.46	1.47	-0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.02	-0.01
(B)	0.07	0.00	0.97	0.22	0.00	0.00	0.02	0.00
(C)	0.03	0.01	0.00	0.01	2.02	2.34	3.43	1.99
(D)	2.82	2.66	2.10	2.09	0.29	0.06	0.11	0.02

Figura 4: Representação esquemática e exemplo da organização da matriz dos arranjos do biosensor mBio®. Imagens representativas e formato da matriz para o multiplex HIV/sífilis /HCV. A matriz tem 30 recursos, sendo formada por 2 linhas e 15 colunas, e inclui antígenos específicos dos patógenos a serem avaliados, bem como múltiplos controles. Com base em métodos de ensaio de referência, as amostras A-C são, cada uma, proveniente de indivíduos monoinfectados, com uma reatividade ao HIV (A), *T. pallidum* (B) e HCV (C). A amostra D tem reatividade para os três patógenos por ambos os métodos de referência. Na tabela inferior estão demonstradas as intensidades das reações imunofluorescentes.

Fonte: Lochhead MJ, Todorof K, Delaney M, Ives JT, Greef C, Moll K, et al. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Oct;49(10):3584–90.

IV.3.4 Perspectivas Futuras

Um novo protótipo do Biosensor multiplex já foi desenvolvido, mas não foi publicado ainda nenhum estudo sobre a aplicabilidade desse novo aparelho. A figura 5 apresenta as suas principais características.

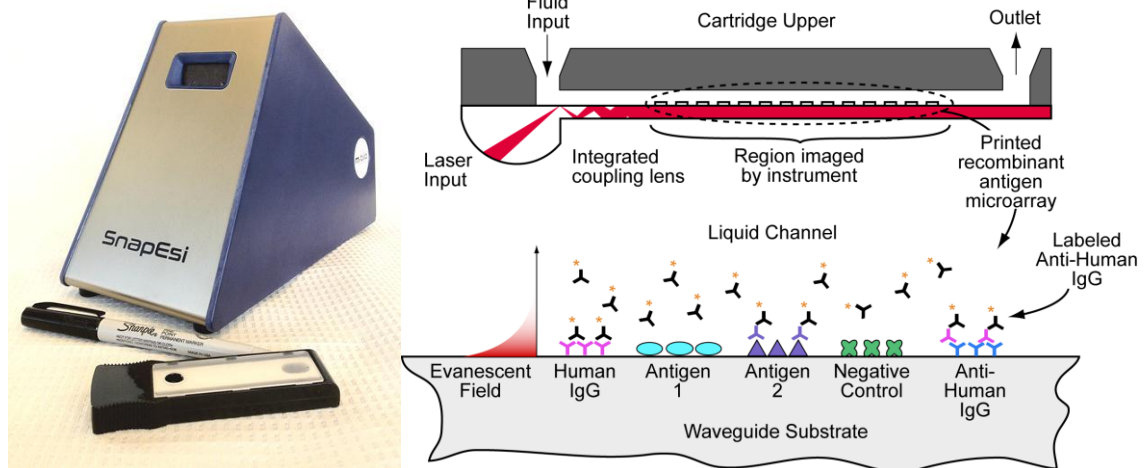


Figura 5: Novo aparelho mBio® SnapEsi e esquema ilustrativo de cartucho com anticorpos e antígenos. (Esquerda): Fotografia do sistema de investigação mBio® SnapEsi. (Direita): Representação esquemática do imunoenensaio de fluorescência no cartucho de teste descartável. Um microchip da proteína é impresso para um condutor de ondas, que está ligado a um componente de plástico superior para definir um canal de fluxo. A amostra colocada tem seus anticorpos detectados pelos reagentes que são introduzidos através de uma entrada de fluido. Um laser é usado para iluminar o guia de ondas. Uma imagem digital de fluorescência do microchip é gerada no instrumento leitor e a intensidade de sinal de cada um dos pontos da matriz é captada automaticamente pelo *software* do sistema.

Fonte: Lochhead MJ, Todorof K, Delaney M, Ives JT, Greef C, Moll K, et al. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Oct;49(10):3584–90.

V. METODOLOGIA

V.1 Delineamento

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica desenvolvido no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (C-HUPES), Salvador-BA, Brasil, entre 2011 e 2012. Avaliou-se 54 indivíduos distribuídos em 3 grupos: i) 36 indivíduos infectados pelo HCV; ii) 8 indivíduos co-infectados por HIV/HCV; e iii) 10 indivíduos não infectados por HIV e/ou HCV (grupo controle).

V.2 Seleção da amostra

Foram selecionados indivíduos que estavam em acompanhamento ambulatorial para infecção pelo vírus HCV e/ou HIV nos serviços de Hepatologia ou na Unidade Docente Assistencial de Infectologia (UDAI) do C-HUPES para o grupo de casos no período de Julho de 2011 a Fevereiro de 2012, e profissionais ou estagiários do C-HUPES sem história de infecção pelos vírus HIV e ou HCV para o grupo de controle, todos maiores de 18 anos. Os indivíduos selecionados foram apresentados ao estudo, e então submetidos a um questionário e coleta sanguínea de 10 ml por punção venosa em tubo seco. As amostras biológicas foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Tropicais, e o Laboratório de Retrovírus, ambos no C-HUPES, para realização das sorologias. A amostra foi de conveniência e o número de indivíduos foi baseado na quantidade de cartuchos que o laboratório tinha disponível para realização dos testes.

V.3 Definição do status de infecção ou não-infecção

No grupo dos casos, foram definidos como portadores de infecção pelo HIV e/ou HCV aqueles indivíduos com confirmação diagnóstica registrada em prontuário médico-hospitalar. No grupo controle, o status de não-infecção por HIV e/ou HCV baseou-se em relato do próprio indivíduo e confirmação por meio de sorologia pela reação imunoenzimática (ELISA).

V.4 Sorologia pelo ELISA

Alíquotas de soros de todos os indivíduos foram enviadas para o Laboratório de Retrovírus do C-HUPES para realização de sorologias para anticorpos anti-HCV e anti-HIV pelo ELISA. Os kits MUREX-HIV ou HIV-tetraDiasorin foram utilizados para avaliação da infecção pelo HIV, ao passo que o kit MUREX anti-HCV de quarta geração foi utilizado na sorologia para avaliação da infecção pelo HCV. Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante.

V.5 Sorologia pelo Biosensor mBio®

Alíquotas dos soros de todos os indivíduos foram enviadas para o Laboratório de Doenças Tropicais, C-HUPES, para realização de sorologia para anticorpos anti-HIV e anti-HCV pelo biosensor modelo SnapShot versão 1.8, número de série: 0004. Tanto o biosensor quanto os cartuchos foram desenvolvidos pelo mBio Diagnostics, Inc., EUA. O protocolo adotado foi o concedido pelo próprio fabricante. Primeiro, diluiu-se o soro em diluente em uma concentração de 3% (6 uL de cada soro/194 uL de diluente concedido pela PPC). Adicionou-se a cada cartucho 175 uL do soro diluído e homogeneizado, e incubou-se 15 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 175 uL de tampão de lavagem, incubou-se 3 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 175 uL de cromógeno, incubou-se 10 minutos em temperatura ambiente e então efetuou-se a leitura do cartucho no biosensor acoplado a um notebook Dell™. Os resultados foram gerados pelo software SnapEpsi® versão 3.4.

V.6 Análise Estatística

O banco de dados foi construído no Microsoft Excel 2010 e baseado em: i) informações sócio-demográficas do questionário (variáveis: idade, sexo, local de residência, grau de escolaridade, história de transfusão sanguínea, história de realização de tatuagens, uso de preservativos na prática sexual, uso de drogas injetáveis, história de infecção pelo HIV e/ou HCV), ii) informações concernentes a presença ou ausência de infecção pelo HIV e/ou HCV registradas em prontuário médico-hospitalar (variáveis:

resultado de sorologias anti-HIV e anti-HCV por meio do ELISA, carga viral, contagem de linfócitos CD4 e CD8, uso de medicamentos antirretrovirais, realização e resultado de biópsia hepática, tratamento para a hepatite C, sinais e sintomas atuais e sorologias para outras doenças infecciosas); iii) resultados de sorologia com o biosensor SnapShot, gerados pelo software SnapEpsi versão 3.4.

Realizou-se análise estatística descritiva baseada em medidas de frequência, tendência central e dispersão, acurácia de teste diagnóstico, e concordância, por meio do índice kappa (k), para avaliar a acurácia do biosensor, comparado ao status de infecção e, sorologia por ELISA.

V.7 Questões Éticas

Este trabalho é um subprojeto do projeto intitulado “Desenvolvimento e aplicações do ‘biochip’ no diagnóstico das doenças infecciosas na Bahia”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Maternidade Climério de Oliveira – HUPES – UFBA, registro 66–17.05.06. A pesquisa atendeu aos requisitos definidos pelos princípios éticos para pesquisa em seres humanos, exigidos pela Resolução 196/96 do CNS, Ministério da Saúde, Brasil (Anexo I). Todos os participantes receberam uma explicação prévia sobre o estudo e consentiram em participar deste, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

VI. RESULTADOS

Foram incluídos 54 indivíduos no estudo. Destes, 36 (trinta e seis) foram classificados como portadores de infecção pelo HCV, 8 (oito) portadores de co-infecção HIV/HCV e 10 (dez) incluídos no grupo controle. As características da amostra total e específicas de cada grupo podem ser observadas na Tabela 01.

VI.1. Perfil da amostra

A média de idade em anos foi semelhante entre os grupos de infectados por HCV e co-infectados HIV/HCV em torno de 50-51 anos, já o grupo controle negativo foi constituído por adultos jovens, média de 28 anos. Quanto ao gênero dos indivíduos, o sexo feminino prevaleceu apenas no grupo de controles negativos, 7/10 indivíduos. Quanto à escolaridade, notou-se que os grupos portadores de alguma das infecções HIV e/ou HCV possuíam um menor grau escolaridade, em contraste com o grupo controle.

Em relação aos conhecidos fatores de risco para infecção pelo HCV, o grupo de indivíduos co-infectados HIV/HCV relataram maior exposição ao risco de infecção no tocante a: história de tatuagem, história de transfusão sanguínea, e história de uso de drogas injetáveis, em comparação aos outros grupos. O relato de prática sexual sem o uso de preservativos, outro importante fator de risco para as infecções pelo HIV e HCV, se destacou entre o grupo de infectados pelo HCV, embora todos os grupos tenham apresentado alta frequência deste hábito.

VI.2. Acurácia dos métodos

A análise da acurácia (Tabela 02) dos dois métodos estudados mostrou maior sensibilidade e valor preditivo negativo do biosensor comparado ao ELISA. A especificidade e valor preditivo positivo de ambos os métodos foi idêntica e igual a 100%.

Tabela 01 – Perfil da população estudada

Grupo	n	Idade média em anos (SD)	Gênero (%)		Grau de Escolaridade (%)			História de Tatuagem (%)	História de Transfusão de Sangue (%)	Prática de Sexo sem Preservativos (%)	Uso de Drogas Injetáveis (%)
			M	F	Ensino Fundamental Completo	Ensino Médio Completo	Ensino Superior Completo				
HCV	36	51,49 (9,72)	20 (55,6)	16 (44,4)	14 (38,9)	17 (47,2)	5 (13,9)	6 (16,7)	6 (17,6)	26 (76,5)	6 (17,6)
HIV/HCV	8	50,5 (9,74)	5 (62,5)	3 (37,5)	5 (71,4)	2 (28,6)	0	4 (57,1)	3 (42,9)	4 (57,1)	2 (28,6)
Controle	10	28,4 (8,53)	3 (30,0)	7 (70,0)	0	4 (44,4)	5 (55,6)	1 (10,0)	0	4 (40,0)	0
TOTAL	54	47,24 (13,02)	28 (51,9)	26 (48,1)	19 (36,5)	23 (44,2)	10 (19,2)	11 (20,8)	9 (18,4)	34 (69,4)	8 (16,7)

Legenda: n= número de indivíduos; SD = Desvio-Padrão; M=Masculino; F=Feminino

Tabela 02 – Desempenho do biosensor comparado ao ELISA em indivíduos infectados pelo HCV ou HCV/HIV

Tipo de Infecção	Sorologia	Resultado Sorologia*	Status da infecção		N	S (%) [IC]	E (%) [IC]	VPP (%) [IC]	VPN (%) [IC]	k [IC]
			Positivo	Negativo						
HCV	ELISA	Positivo	29	0	46	80,5 [0,6 – 0,9]	100 [0,7 – 1,0]	100,0 [0,9 – 1,0]	58,8 [0,3 – 0,8]	0,643 [0,4 – 0,9]
		Negativo	7	10						
		TOTAL	36	10						
	Biosensor	Positivo	32	0	46	88,9 [0,9 – 1,0]	100,0 [0,6 – 1,0]	100,0 [0,9 – 1,0]	66,7 [0,4 – 0,9]	0,744 [0,5 – 1,0]
		Negativo	4	8						
		TOTAL	36	10						
HIV/HCV	ELISA	Positivo	7	0	18	87,5 [0,5 – 1,0]	100,0 [0,7 – 1,0]	100,0 [0,6 – 1,0]	90,9 [0,6 – 1,0]	0,886 [0,7 – 1,0]
		Negativo	1	10						
		TOTAL	8	10						
	Biosensor	Positivo	8	0	18	100,0 [0,6 – 1,0]	100,0 [0,6 – 1,0]	100,0 [0,6 – 1,0]	100,0 [0,6 – 1,0]	1,0
		Negativo	0	8						
		TOTAL	8	10						

Legenda: n = número de indivíduos, S = Sensibilidade, E = Especificidade, VPP = Valor Preditivo Positivo, VPN = Valor Preditivo Negativo, k = índice Kappa, IC = Intervalo de Confiança

* Nota: dois resultados da sorologia com o biosensor foram considerados indeterminados.

VII. DISCUSSÃO

Neste estudo preliminar da acurácia desse novo método sorológico foi verificada uma sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativo de 100% na avaliação da co-infecção HIV/HCV pelo aparelho, se mostrando equivalente neste aspecto ao método ELISA usado rotineiramente. Já na avaliação da infecção isolada pelo HCV, o novo método mostrou maior sensibilidade e valor preditivo negativo e especificidade e valor preditivo positivo equivalentes ao método ELISA ao qual foi comparado, demonstrando uma boa acurácia do método.

A epidemia da infecção pelo HIV tem motivado o desenvolvimento de múltiplos métodos diagnósticos que visam facilitar o manuseio destes pacientes, os quais apresentam muitas vezes mais de uma infecção. A disponibilidade de testes que possam detectar simultaneamente diversas co-infecções é um importante avanço para a tomada de condutas adequadas à atenção e assistência a um paciente com infecção pelo HIV e seus co-patógenos comuns. No momento do diagnóstico de uma infecção pelo HIV, é importante realizar a investigação de infecções relacionadas, tais como pelo HCV, HBV, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum* e citomegalovírus, entre outros, devido, a depender do patógeno, aos fatores de risco em comum e da possibilidade de desenvolvimento de infecções oportunistas, em um contexto de imunossupressão (38, 39). Este sistema multiplex do biosensor que foi estudado tem a possibilidade de oferecer uma combinação de testes críticos que detectam patógenos múltiplos em um único ensaio, satisfazendo o desejo reconhecido para plataformas de combinação de teste (40).

O aumento do acesso à terapia anti-retroviral em países de recursos limitados, em particular da África subsaariana, pressupõe um diagnóstico rápido e um controle paralelo das múltiplas co-infecções associadas (41.) Uma plataforma multiplex que fornece informações rápidas e precisas sobre co-infecções críticas poderiam ajudar a priorizar os que devem ser tratados e fornecer orientação sobre a seleção de medicamentos antirretrovirais nestes países, bem como direcionar o tratamento precoce para as infecções concomitantes.

Além de fornecer subsídios para decisões de tratamento antivirais com base em informação de co-infecções, a capacidade de detectar simultaneamente múltiplos marcadores de agentes patogénicos na mesma amostra oferece várias vantagens diagnósticas. É sabido que a infecção por HIV-HCV tem prognóstico e conduta diferentes daqueles com uma única infecção (42-44). Um teste de co-infecção com HIV/HCV pode ajudar a identificar esses pacientes no momento da triagem inicial.

O sistema apresentado aqui oferece várias vantagens técnicas potenciais sobre as tecnologias existentes. O mais significativo é a capacidade de executar quantitativos imunoenaios multiplexados em sangue total com resultados em alguns minutos no próprio local de atendimento do paciente.

Argumentos contra esses novos tipos de instrumentos diagnósticos são a complexidade e custo elevado, quando comparados com os testes de leitura visual já mundialmente difundidos. Não obstante, há uma crescente consciência das limitações e dificuldades de uso destes testes rápidos de leitura visual, em particular, pela subjetividade, dependência e treinamento do observador.

Estes resultados preliminares foram fundamentais para o aprimoramento do equipamento, que na sua nova versão tem uma estrutura mais simplificada e automatizada, objetivando oferecer os resultados em poucos minutos.

VIII. CONCLUSÕES

- 1- O biosensor desenvolvido pela mBio® possui uma maior sensibilidade e valor preditivo negativo, e especificidade e valor preditivo positivo equivalentes, em comparação aos métodos diagnósticos de rotina avaliados para o diagnóstico das infecções pelo HCV e/ou HCV/HIV;
- 2- O aparelho estudado apresentou resultados com boa concordância em relação ao conhecimento prévio do *status* de infecção do paciente;
- 3- O método estudado mostrou-se capaz de detectar diferentes infecções (HCV e HIV) simultaneamente;
- 4- Os pacientes co-infectados com HCV/HIV foram os que apresentaram menor escolaridade entre os grupos estudados;
- 5- Os pacientes co-infectados com HCV/HIV foram os que mais frequentemente relataram histórias de transfusão sanguínea, realização de tatuagem e o uso de drogas injetáveis;
- 6- Os pacientes infectados exclusivamente com o HCV foram os que mais frequentemente relataram prática de sexo sem o uso de preservativos.

IX. SUMMARY

EVALUATION OF THE ACCURACY OF A BIOSENSOR PROTOTYPE IN THE SIMULTANEOUS RECOGNITION OF SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS C VIRUS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

The Biosensor presents a new perspective in the diagnosis of infectious and parasitic diseases, with a view that has a number of advantages, such as ease of use, portability, speed of results and the ability to detect different infections simultaneously. In this pilot study, a prototype of a Biosensor was evaluated to detect anti-HCV and anti-HIV antibodies in individuals followed at the University Hospital Complex Professor Edgard Santos, Bahia, Brazil. The main objective of the study was to evaluate the diagnostic accuracy of this new method. Serology was realized with mBio ® Biosensor and ELISA method, used in laboratory routine, for anti-HIV and anti-HCV in 54 subjects (n = 36 subjects with HCV, n = 8 subjects with HIV / HCV, and 10 subjects without infection). The laboratory findings were compared with clinical findings to calculate measures of accuracy and concordance between tests. The technique of the biosensor showed a higher sensitivity and negative predictive value in detecting HCV infection, co-infection HCV / HIV and in the absence of infection, when compared to conventional ELISA method. Moreover, specificity and positive predictive value for both methods were equivalent and equal to 100%. The biosensor in study has demonstrated a higher accuracy when compared to routine ELISA method, so this new method could be a great perspective in the diagnosis of infectious diseases. The possibility to detect co-infections simultaneously in the same sample, the speed of results, the ease of use and portability are important advantages of this new method to evaluate and conduct patients infected with HIV or HCV.


Keywords: biosensor, coinfection, HIV, hepatitis C.

X. ANEXOS

Anexo 1: Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO I

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

 Rua Padre Feijó 240, Canela - Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 Cep.: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax.: (71) 203-2740 E-MAIL: cep_inco@yahoo.com.br

PARECER/RESOLUÇÃO N.º 60/2006

Registro CEP. 66 - 17.05.06.

Projeto de Pesquisa. “Desenvolvimento e aplicações do “biochip” no diagnóstico das doenças infecciosas na Bahia”.

Patrocínio/Financiamento. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, **FAPESB**.

Pesquisador Responsável. Eduardo Martins Netto, “Currículum Vitae” anexo. **Co-investigadores.** Diana Pedral Sampaio, Carlos Roberto Brites e Roberto Badaró, “Currícula Vitae” apensos.

Instituição. Unidade Docente Assistencial de Infectologia (UDAI) do HUPES.

Área do Conhecimento. Medicina, 4.01, Nível D, Grupo I.4. Importação do material normatizada.

Objetivos. 1 – montagem dos Biochip Readers, preparação dos Biochips específicos (cartões diagnósticos) e acoplamento das unidades de fluidos na Bahia; 2 – otimização dos Biochips entre as instituições participantes; 3 – validação e otimização dos Biochips produzidos para detecção de múltiplos patógenos; 4 – ajuste e melhoramento pós-teste do protótipo Biochip.

Sumário. Trata-se do desenvolvimento de novo dispositivo que representa inovação marcante para o diagnóstico de doenças infecciosas usando amostras biológicas armazenadas no Laboratório de Doenças Tropicais da UFBA. **Critérios de inclusão.** Amostras biológicas de pacientes com HIV, HTLV, Tuberculose, Hepatite B, Hepatite C e Leishmaniose. **Critérios de exclusão** inexistente. **Orçamento** não detalhado sendo citado apenas seu resumo. **Cronograma de execução** bem detalhado. **Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido** dispensável, por tratar-se de análise em material biológico armazenado em banco de dados existente na UDAI e só utilizado para comparação diagnóstica com as mesmas patologias inicialmente identificadas. O Pesquisador Responsável e o Diretor Hospitalar aceitaram cumprir todas as normas em vigor.

Comentários. Fundamentação teórica bem explicitada. Haverá transferência de Tecnologia. Projeto aprovável com subida à CONEP.

Aprovado.

Salvador, 20 de junho de 2006.

Coordenador.

Prof. Dr. Antônio dos Santos Barrata
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisas Humanas
 MCO - Universidade Federal da Bahia

Observação importante. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas "Recomendações Adicionais" apenas, bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo de pesquisa. Antes de aceitar o convite, é importante entender os objetivos e o porquê de tal estudo estar sendo realizado. Estamos abertos a esclarecer qualquer dúvida e a dar qualquer informação solicitada. O(a) senhor(a) não é obrigado e tem o tempo que julgar necessário para decidir se vai aceitar ou não o convite, além de ter o direito de desistir de participar do estudo em qualquer momento, retirando assim o seu consentimento. Segue abaixo algumas informações:

Título do Estudo: “Aplicações do Biochip no diagnóstico de doenças infecciosas na Bahia”

Local: Laboratório de Tropical, situado no andar térreo do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos (C-HUPES).

Período: 2011 a 2012

Equipe: Investigador Principal: Dr. Roberto Badaró

Investigadores: MSc. Zuinara Pereira, MSc. Maria Nakatani, Monique Lírio e Victor Castro Lima.

A equipe poderá ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas. Rua Augusto Viana, s/n, 6º andar, Canela 40110160 - Salvador, BA – Brasil.

Informações sobre o estudo

Esta pesquisa consiste na avaliação da eficácia de uma nova ferramenta para diagnóstico de doenças infecciosas como HIV, Hepatite C e Sífilis, chamada “biochip”. A vantagem desse novo método em relação aos que já existem é que ele é mais rápido, barato e de fácil manuseio. Porém, é preciso avaliar se esse novo método realmente funciona e se é tão bom quanto os que já existem para diagnosticar essas doenças. É justamente com o objetivo de fazer essa avaliação que esse estudo está sendo realizado.

O(a) senhor(a) foi selecionado por ser paciente do C-HUPES com suspeita de infecção por HIV, HCV ou *Treponema pallidum*. Sua participação nesta pesquisa consistirá apenas na doação de duas amostras de sangue (um total de 10 mL), além do que você já forneceu para a realização dos seus exames de acompanhamento, e no preenchimento de um questionário sobre o seu estado de saúde. Depois disso, o(a) senhor(a) não terá mais qualquer compromisso com a pesquisa e as suas amostras de sangue, bem como os seus dados pessoais, ficarão sob a responsabilidade legal da equipe que está realizando o estudo, sendo que todas as suas informações pessoais serão mantidas em sigilo. Qualquer informação que saia do hospital sobre você terá o seu nome, endereço ou qualquer outra forma de identificação, removidos. Ao final da pesquisa o(a) senhor(a) terá acesso aos resultados dos exames e receberá esclarecimentos sobre os mesmos. É importante que o(a) senhor(a) esteja ciente de que existe o risco de, durante o estudo, ocorrer a identificação de uma infecção silenciosa (não conhecida por você) por HIV, HCV ou *Treponema pallidum*. Caso isso venha a ocorrer, o(a) senhor(a) será encaminhado(a) ao ambulatório de infectologia do hospital para confirmação do diagnóstico e acompanhamento.

É esperado que os resultados do estudo possam beneficiar você, porém esses benefícios, se existirem, não serão imediatos. As informações que obtivermos deste estudo poderão nos ajudar a diagnosticar melhor no futuro outros pacientes com infecção por HIV, HCV ou *T. pallidum*. Caso você seja portador(a) de infecção pelo HIV, Hepatite C, ou Sífilis, poderá iniciar logo o tratamento. Diminuindo assim, a possibilidade de agravamento da doença.

Esse estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do C-HUPES. Não foi estabelecida previamente nenhuma compensação especial para casos em que o(a) paciente sintasse prejudicado(a) por ter participado do projeto de pesquisa. Se for

prejudicado(a) pelo erro ou desatenção de algum profissional, poderá acionar a pessoa na justiça, assumindo o custo normal do processo. Além disso, se desejar apresentar queixa de qualquer aspecto do modo como foi orientado(a) ou tratado(a) durante a pesquisa, você poderá manter contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** do C-HUPES, telefone (71) 3283-8140.

Número da Identificação do indivíduo nesse estudo: _____

CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do Estudo: “Aplicações do Biochip no diagnóstico de doenças infecciosas na Bahia”

Local: Laboratório Tropical, situado no andar térreo do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos (C-HUPES).

Período: 2011 a 2012

Investigador Principal: Dr. Roberto Badaró

Contato: (71) 3283-8122 (Laboratório Tropical)

Antes de assinar este documento, eu fui suficientemente informado(a) sobre o projeto de pesquisa: os objetivos, os inconvenientes, os benefícios e os riscos que podem ocorrer quando eu estiver participando da pesquisa. Eu conversei diretamente com o pesquisador e ele respondeu todas as perguntas que fiz com relação à pesquisa, sem deixar dúvidas. Eu sei que posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Aceito participar voluntariamente da pesquisa, permitindo que meus registros médicos sejam inspecionados por representantes da empresa que patrocina a pesquisa e por representantes do governo para conferir se o estudo está sendo realizado corretamente.

_____	_____	_____
Nome do indivíduo	Assinatura	Data
_____	_____	_____
Nome do representante	Assinatura	Data
_____	_____	_____
Pessoa que apresentou a pesquisa	Assinatura	Data
_____	_____	_____
Investigador-principal	Assinatura	Data



Universidade Federal da Bahia
Hospital Universitário Professor Edgard Santos
Laboratório Tropical



Questionário

Pesquisa: "Aplicações do Biochip do diagnóstico das doenças infecciosas na Bahia"

Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: () F () M
Prontuário: _____ Local de Residência: _____ Telefone: _____

Qual seu grau de Escolaridade? _____ Pratica sexo sem preservativo? () Sim () Não
Possui tatuagem? () Sim. Há quanto tempo? _____ () Não Faz ou fez uso de drogas ilícitas injetáveis? () Sim () Não
Já recebeu transfusão de sangue? () Sim. Há quanto tempo? _____ () Não

Apresenta Infecção por HIV? () Sim () Não Contagem de CD4+: _____ Contagem de CD8+: _____
Em caso afirmativo, preencha: Carga viral: _____
Faz tratamento Anti-Retroviral? () Sim. Desde quando? _____ () Não

Apresenta Infecção por *T. pallidum*? () Sim () Não. Já teve? _____
Possui VDRL? () Sim. Qual o resultado? _____ Data: ____/____/____ () Não
Possui FTA-Abs? () Sim. Qual o resultado? _____ Data: ____/____/____ () Não
Outros exames complementares: _____

Apresenta Infecção por HCV? () Sim () Não Anti-HCV Data: ____/____/____ () Não
Biópsia: () Sim. Achados histopatológicos: _____ Data: ____/____/____ () Não
Tratamento: _____
Sinais e sintomas atuais: _____

Apresenta Co-infecção: () Sim () Não
() Tuberculose () CMV () Leishmaniose () Toxoplasmose () Candidíase () Hanseníase () HTLV
Outra: _____

Obs.: _____
Responsável pela aplicação do questionário: _____

REFERÊNCIAS

1. Global Burden of Hepatitis C working group. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *Journal of clinical pharmacology*. 2004 Jan;44(1):20–9.
2. World Health Organization [homepage na internet]. Hepatitis C. [acesso em 12 de Dezembro de 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
3. Venegas M, Brahm J, Villanueva R. Genomic determinants of hepatitis C virus antiviral therapy outcomes: toward individualized treatment. *Annals of hepatology*. 2012;11(6):827–37.
4. Jang JY, Chung RT. Chronic hepatitis C. *Gut and liver*. 2011;5(2):117–32. Available from:
5. Farci P, Alter HJ, Wong D, Miller RH, Shih JW, Jett B, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 1991;325(2):98–104.
6. Farci P. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):339–44.
7. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, et al. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science*. 1992 Oct 2;258(5079):135–40.
8. Yano M, Kumada H, Kage M. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23:1334.
9. Kallwitz ER, Layden-Almer J, Dhamija M, Berkes J, Guzman G, Lepe R, et al. Ethnicity and body mass index are associated with hepatitis C presentation and progression. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010 Jan;8(1):72–8.
10. Seto WK, Lai CL, Fung J, Hung I, Yuen J, Young J, et al. Natural history of chronic hepatitis C: genotype 1 versus genotype 6. *Journal of hepatology*. European Association for the Study of the Liver; 2010 Sep;53(3):444–8.
11. Tohme R, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):1497–505.
12. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Milestones in liver disease*. 2002;36:582–5.

13. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997;25:1527.
14. Oliveira-Filho AB, Pimenta ASC, Rojas MFM, Chagas MCM, Crescente JAB, Crespo DM, et al. Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010 Feb;105(1):103–6.
15. Vigani AG, Pavan MH, Tozzo R, Gonçalves ESL, Feltrin A, Fais VC, et al. Comparative study of patients with chronic hepatitis C virus infection due to genotypes 1 and 3 referred for treatment in southeast Brazil. *BMC infectious diseases*. 2008 Jan;8:164.
16. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases*. 2005 Sep;5(9):558–67.
17. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, Mcquillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The Prevalence of Hepatitis C Virus Infection in the United States , 1999 through 2002. *Annals of Internal Medicine* 2006;144(10).
18. Centers for Disease Control and Prevention [homepage na internet]. Viral Hepatitis Statistics and Surveillance [acesso em 12 de Dezembro de 2012]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hepatitis/Statistics/2010Surveillance/index.htm>.
19. Murphy EL, Bryzman SM, Glynn SA. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. *NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS)*. *Hepatology*. 2000;31:756.
20. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico “Hepatites Virais”. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
21. Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *Journal of hepatology*. 2006 Jan;44(1 Suppl):S6–9.
22. Rauch A, Rickenbach M, Weber R, Hirschel B, Tarr PE, Bucher HC, et al. Unsafe sex and increased incidence of hepatitis C virus infection among HIV-infected men who have sex with men: the Swiss HIV Cohort Study. *Clinical infectious diseases*. 2005 Aug 1;41(3):395–402.
23. McGovern BH. Hepatitis C in the HIV-infected patient. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2007 Jul 1;45 Suppl 2:S47–56;
24. Daar ES, Lynn H, Donfield S, Gomperts E, O’Brien SJ, Hilgartner MW, et al. Hepatitis C virus load is associated with human immunodeficiency virus type 1 disease progression in hemophiliacs. *The Journal of infectious diseases*. 2001 Feb 15;183(4):589–95.

25. Yoo TW, Donfield S, Lail A, Lynn HS, Daar ES. Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease. *The Journal of infectious diseases*. 2005 Jan 1;191(1):4–10.
26. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology*. 2004;39(4).
27. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26:43.
28. Busch MP, Tobler LH, Tegtmeier G, Polito A, Quan S, Hirschler N V, et al. Use of third-generation hepatitis C virus (HCV) enzyme immunoassay (EIA) to resolve second-generation HCV EIA-reactive and second-generation recombinant immunoblot assay-indeterminate blood samples: data to support current Food and Drug Administration guidance on HCV lookback. *Transfusion*. 2000;40(January):10–4.
29. Gürtler L. HIV series Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *The Lancet*. 1996;348:176–9.
30. Horsburgh CRJ, Ou CY, Jason J. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *The Lancet*. 1989;(2):637.
31. Knop LB. Estudo piloto para utilização da nova tecnologia de biossensor no diagnóstico das doenças infecciosas. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; 2007.
32. Engvall E, Perllman P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology*. 1972;(1):129–35.
33. Xerri L. Biochips and their applications in pathology. *Annals of pathology*. 2003;(1):35–9.
34. D’Orazio P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clinica chimica acta: international journal of clinical chemistry*. 2011 Sep 18;412(19-20):1749–61.
35. Golden JP, Taitt CR, Shriver-Lake LC, Shubin YS, Ligler FS. A portable automated multianalyte biosensor. *Talanta*. 2005 Mar 15;65(5):1078–85.
36. Ligler FS, Sapsford KE, Golden JP, Shriver-Lake LC, Taitt CR, Dyer M a, et al. The array biosensor: portable, automated systems. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2007 Jan;23(1):5–10.
37. Lochhead MJ, Todorof K, Delaney M, Ives JT, Greef C, Moll K, et al. Rapid multiplexed immunoassay for simultaneous serodiagnosis of HIV-1 and coinfections. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Oct;49(10):3584–90.

38. Hammer SM. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society—USA panel. *JAMA* 2008;300:555–570.
39. Kaplan JE. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR*. 2009; Rep. 58(RR-4):1–207.
40. Urdea M. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature*. 2006;444(Suppl. 1):73–79.
41. World Health Organization. [homepage na internet] Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. Progress report 2010. [acesso em 7 de Janeiro de 2013] Disponível em: <http://www.who.int/hiv/pub/2010progressreport/report/en/index.html>.
42. Chamot E. Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. *AIDS*. 1990;4:1275–1277.
43. Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 2010;51:700–708.
44. Thio CL. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:575–577.

