

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DAS MENINGITES E ENCEFALITES
LINFOCITÁRIAS PELA AMPLIFICAÇÃO DO DNA PATOGÊNICO
EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO HIV**

Marisa Chesky
Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Jobim
Dissertação de Mestrado
Fevereiro de 2004

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha sempre muito grande amiga Carmen Maria Pinheiro (*in memoriam*) que confiou na viabilidade deste trabalho e na minha capacidade muito antes da sua elaboração concreta

A VERDADE DIVIDIDA

A PORTA da verdade estava aberta
mas só deixava passar
meia pessoa de cada vez.
Assim não era possível atingir toda a verdade
porque a meia pessoa que entrava
só conseguia o perfil de meia verdade.
E sua segunda metade
voltava igualmente com meio perfil.
E os meios perfis não coincidiam
Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.
Chegaram ao lugar luminoso
onde a verdade esplendia os seus fogos.
Era dividida em duas metades
diferentes uma da outra.
Chegou-se a discutir qual a metade
mais bela.
E era preciso optar. Cada um optou
conforme seu capricho, sua ilusão, sua miopia.

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Luiz Fernando Jobim, meu orientador, que me colocou no caminho da biologia molecular, pelo estímulo e confiança na idealização e orientação desta dissertação
- Aos meus familiares, em especial às minhas sobrinhas Andréa e Natacha pelo auxílio na versão inglesa do artigo e na formatação do texto da dissertação
- À minha amiga Dr^a Luciane Failace, pela disponibilidade, pelo incentivo, pelas correções e sugestões sempre muito pertinentes
- Ao Steven Read pela atenção especial dedicada ao meu treinamento no laboratório de Virologia Clínica do Public Health Laboratory, Oxford
- Ao Dr. Afonso Barth que me disponibilizou espaço no laboratório de pesquisa para que eu pudesse, com tranquilidade, redigir grande parte deste trabalho
- À colega de laboratório, Alice Beatriz Pinheiro Machado, pela compreensão nesta fase final da minha dissertação, assumindo algumas vezes, as suas e as minhas tarefas no trabalho diário
- À minha amiga Rosana Scalco que me acompanhou na etapa inicial deste projeto e muito auxiliou na coleta das informações iniciais deste estudo
- À minha grande amiga Maria Donata Mallmann pelo incentivo e pela compreensão do meu silêncio temporário
- A todos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos colegas do Serviço de Patologia Clínica, que realizaram os exames de análise do líquido e no sangue, dados estes que foram utilizados para avaliar a reação em cadeia da polimerase.

“Ninguém ignora tudo, ninguém sabe tudo. Por isso aprendemos sempre.” (Paulo Freire)

ÍNDICE

página

ABREVIATURAS	6
INTRODUÇÃO	8
REVISÃO DA LITERATURA	9
-Aspectos históricos do diagnóstico das meningites e encefalites virais	9
-O sistema nervoso central e as vias de entrada das infecções	11
-Meningites virais	12
-Diagnóstico laboratorial	13
-Encefalites virais	14
-Diagnóstico laboratorial	14
-Fatores predisponentes das encefalites e meningites virais	14
-Pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana SIDA	15
-Diagnóstico das meningites e encefalites assépticas	16
-Patógenos oportunistas e seu diagnóstico por PCR	23
OBJETIVOS	42
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	43
ARTIGO EM INGLÊS	56
ARTIGO EM PORTUGUÊS	75
ANEXO	95

ABREVIATURAS

b-DNA - Branched DNA

CD - Cluster of differentiation

CD4⁺ - Linfócito T auxiliar

CMV - Citomegalovírus

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EBV - Epstein-Barr vírus

EIE - Enzima imunoensaio

ET - Encefalite toxoplásmica

HAART- Highly active antiretroviral therapy

HHV-6 - Herpes humano vírus tipo 6

HIV – Human immunodeficiency virus

HSV - Herpes simplex vírus

HZV - Herpes zoster vírus

IgG - Imunoglobulina do tipo G

IgM - Imunoglobulina do tipo M

JCV - JC vírus

Kpb - Kilo pares de bases

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LMP - Leucoencefalopatia multifocal progressiva

LPSNC - Linfoma primário do sistema nervoso central

MAC - *Mycobacterium avium* complex

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

NMT- Non *Mycobacterium tuberculosis*

ABREVIATURAS

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RCL - Reação em cadeia da ligase

RM - Ressonância magnética

RNA - Ácido ribonucléico

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC - Sistema nervoso central

TB - Tuberculose

TCC - Tomografia computadorizada do cérebro

C524d Chesky, Marisa

Diagnóstico etiológico das meningites e encefalites linfocitárias pela amplificação do DNA patogênico em pacientes com infecção pelo HIV / Marisa Chesky ; orient. Luiz Fernando Jobim . – 2005.

96 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Infecção por HIV 2. Meningite 3. Encefalite 4. Reação em cadeia da polimerase I. Jobim, Luiz Fernando II. Título.

NLM: WC 503.1

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

INTRODUÇÃO

A caracterização etiológica das neuroviroses constitui um desafio em nosso meio, não só, pela escassez de laboratórios centrais de referência para estas enfermidades, mas também pela falta de testes diagnósticos rápidos e sensíveis. Uma variedade de meningites assépticas, encefalites e vasculites cerebrais deixam de ter um diagnóstico etiológico pela ausência de um padrão ouro adequado (94). Com o advento de quimioterápicos específicos, uma identificação acurada e precoce do agente causal da infecção possibilitará um melhor manejo do paciente (82), além de permitir ações de saúde pública, quando necessário.

A emergência do vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumentou a necessidade de testes laboratoriais mais sensíveis, mais rápidos e menos invasivos para diagnosticar as conseqüências secundárias desta patologia: as infecções oportunistas (51).

As conseqüências da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) no sistema nervoso central (SNC) são devastadoras e foram bem avaliadas em estudos histológicos *post mortem* (12, 61, 77). Aproximadamente 40% dos pacientes com SIDA desenvolverão manifestações neurológicas importantes durante o curso da doença (62). Estes processos infecciosos podem ser provocados pelo próprio HIV ou por uma série de agentes oportunistas tais como *Toxoplasma gondii*, vírus JC (JCV), citomegalovírus (CMV), vírus da varicela zoster (HZV), vírus do Herpes simplex (HSV), vírus do Epstein-Barr (EBV), micobactérias (100, 67) vírus do herpes humano tipo 6 (HHV-6) (55), além de alguns fungos como o *Cryptococcus* (10) e outras bactérias. Estas síndromes se apresentam com sinais e sintomas inespecíficos e variados, podendo ocorrer múltiplos processos patológicos no SNC de um mesmo paciente, assim, se tornando quase impraticável o diagnóstico clínico (62).

A biópsia cerebral é ainda considerada o padrão ouro no diagnóstico das encefalites virais, mas é pouco utilizada pela sua natureza invasiva. O isolamento viral do líquido cefalorraquidiano (LCR) em cultura celular tem se mostrado ineficiente para a

maioria das meningites e encefalites virais, por ser um método muito lento e pouco sensível (92). No contexto destas limitações, testes de amplificação de ácidos nucleicos, em especial a PCR, têm sido avaliados no diagnóstico das infecções virais. Uma das vantagens mais importantes destes testes é a rapidez na obtenção dos resultados (85).

REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos históricos do diagnóstico das meningites e encefalites assépticas

Em 1893, Ludwig Lichtheim, fez os primeiros registros sobre o valor da análise bioquímica do líquido cefalorraquidiano, ao observar que os níveis de glicose estavam baixos nas meningites tuberculosa e bacteriana aguda (63).

Adair et al. em 1953, ao estudarem 854 líquores de pacientes com meningite asséptica aguda, constataram leucocitose, com predomínio inicial de polimorfonucleares, que entre 8-48 horas mudou para um perfil linfocitário, com celularidade entre 100 e 1000 células/mm³, além da glicorraquia normal e proteinorraquia levemente aumentada (3). Em outro estudo de avaliação laboratorial do LCR na encefalite por HSV, Nahmias et al. encontraram pleocitose em 97% dos casos (79).

Na década de 70, surgiram os ensaios de enzima imunoensaio, com a pesquisa de anticorpos sendo empregada no diagnóstico das meningites e encefalites virais, entretanto com baixa sensibilidade nos estágios precoces da infecção (22).

Também em 1953, teve início a era da biologia molecular, quando James D. Watson e Francis Crick elucidaram a estrutura helicoidal dupla do DNA. Estes pesquisadores sugeriram que a organização de complementaridade própria do DNA era o meio através do qual o material genético poderia ser copiado em cada geração. Na década de 70, com o emprego de endonucleases de restrição sítio específicas, o DNA de uma bactéria já podia ser cortado, surgindo a tecnologia do DNA recombinante ou a clonagem de genes. Logo, obteve-se a seqüência exata do DNA de cada gene, sua

localização e sua capacidade codificadora. Baseados nestes fundamentos em 1971, Kleppe et al. (53) descreveram um procedimento para a replicação de uma região de DNA de fita dupla, utilizando um par de *primers* sintéticos e uma enzima DNA polimerase não estável (fragmento de Klenow). Mas, foi o bioquímico Kary Mullis e seus colegas da Cetus Corporation que desenvolveram a reação em cadeia da polimerase (PCR) isto é, o conceito de usar tal procedimento num formato repetitivo de amplificação (98).

Em 1985, surge a publicação da primeira utilização da PCR no diagnóstico clínico (98). A técnica se mostrava muito laboriosa, sendo necessário simplificar o processo. Logo, a adição da enzima DNA polimerase após cada etapa de desnaturação e o controle manual da mudança de temperatura, mergulhando uma estante de tubos em diferentes banhos-maria e a contabilização dos ciclos da reação foram eliminados. A utilização de uma enzima termoestável, *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* (97), possibilitou a automatização da PCR, além de melhorar a especificidade e a sensibilidade da amplificação.

Com sua grande sensibilidade, sua inerente especificidade e vasta versatilidade, a PCR foi considerada uma técnica com potencial para preencher lacunas no diagnóstico das doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias de crescimento lento, fastidiosas ou não cultiváveis, além de fungos e protozoários (109).

Numerosas publicações começaram a surgir para validar a PCR no diagnóstico e monitoramento dos diferentes agentes etiológicos das infecções do SNC.

Burg et al. em 1989, amplificaram DNA do *Toxoplasma gondii* por PCR, empregando como alvo uma seqüência repetitiva do gene B1, que aparece 35 vezes no genoma. O limite de detecção do teste foi de 10 parasitas por amostra, criando perspectivas para sua aplicação no diagnóstico da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos e infectados congenitamente (14).

No ano de 1990 surgem as primeiras publicações avaliando a PCR no diagnóstico da encefalite herpética (89, 97).

Ainda em 1990, Eisenach et al. (35) amplificaram uma seqüência de DNA do *M. tuberculosis* usando *primers* de um segmento repetitivo do cromossomo, sugerindo que a amplificação desta região genômica poderia ser a base para detectar *M. tuberculosis* diretamente de amostras clínicas.

Em 1992, Shoji et al. (101) publicaram um dos primeiros protocolos de PCR para o diagnóstico das meningites pelo HZV, prevendo sua aplicação diagnóstica e epidemiológica.

Ainda em 1992, três artigos foram publicados simultaneamente na mesma revista, todos mostrando alta correlação entre os achados da autópsia do SNC e a PCR líquórica, no diagnóstico das disfunções neurológicas associadas ao citomegalovírus em pacientes com SIDA (27, 44, 118).

Cinque et al. (24) em 1993, reportaram excelente desempenho da PCR na amplificação do DNA do Epstein-Barr vírus no líquido de pacientes com linfoma primário do sistema nervoso central (LPSNC) associado à SIDA.

Em 1996, de Luca et al. (32) propuseram um protocolo de nested PCR 100% específico para detectar o vírus JC (JCV) no líquido de pacientes com SIDA como opção diagnóstica não invasiva para a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP).

Atualmente, a utilização da PCR no diagnóstico microbiológico, além de amplificar o DNA do agente causal da infecção diretamente da amostra, oferece a possibilidade de tipar o microrganismo, fornecer dados sobre a patogênese, epidemiologia e tratamento da doença. Pode-se ainda monitorar o tratamento pela quantificação do patógeno e detectar mutações que conferem resistência às drogas, pela amplificação de seqüências distintas do genoma (69).

O sistema nervoso central e as vias de entrada da infecção

O cérebro poderia ser um alvo fácil para as infecções causadas por diferentes microrganismos patogênicos, pois é desprovido de sistema linfático e possui poucas

células imunocompetentes migrando através de seu parênquima. O líquido cefalorraquidiano normal possui uma celularidade inferior a 5 linfócitos/mm³. Entretanto a proteção à infecção viral é um sistema de defesa tão eficiente que menos de 1% de crianças não imunes infectadas com o vírus da poliomielite desenvolveram encefalite (30).

O patógeno pode invadir o organismo por diferentes vias. A maioria dos vírus (caxumba, varicela, sarampo) penetra através do trato respiratório. O vírus da poliomielite infecta através da via oral, o HSV pode infectar a partir da rota oral ou sexual e a infecção pelo vírus da raiva, se dá pela inoculação através de picadas de animais. O feto pode ser infectado transplacentariamente, por exemplo, pelo vírus da rubéola, CMV e HIV. Sabe-se que a maioria dos vírus que provoca doenças sistêmicas não chega a infectar o SNC, mas se a viremia for massiva e existirem outros fatores favoráveis, ocorrerá a infecção do SNC via capilares cerebrais e plexos coróides. Outra maneira de atingir o SNC é através dos nervos periféricos, como acontece com a ativação do HSV latente, que pode chegar ao cérebro por meio das ramificações do nervo trigêmeo (47).

Meningites virais

A inflamação das leptomeninges é uma das manifestações mais comuns da infecção do SNC, normalmente causada por vírus. É denominada meningite por não apresentar envolvimento do cérebro (encefalite) e da medula (mielite), mas alguns microrganismos podem causar uma combinação de sintomas e sinais consistentes com meningoencefalite ou encefalomielite (30).

As meningites virais são também denominadas meningites assépticas, embora os termos não sejam exatamente sinônimos um do outro. A síndrome das meningites assépticas, das quais as viroses são as causas mais freqüentes, é assim nomeada pela ausência de uma etiologia bacteriana identificável (15). Entretanto, algumas bactérias de difícil cultivo como *Leptospira*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma*

pneumoniae, *Listeria*, *Brucella*, micobactérias, rickesias, fungos e protozoários como o *Toxoplasma gondii* podem apresentar manifestações clínicas relacionadas à síndrome das meningites assépticas. Estes sintomas também podem ser encontrados em pacientes com meningite bacteriana parcialmente tratada e em pacientes com patologias de origem não infecciosa como doenças autoimunes e invasão das leptomeninges por tumores (82).

Diagnóstico laboratorial

Os achados laboratoriais característicos do LCR nas meningites virais compreendem: presença inferior a 500 células mononucleares/mm³, embora uma punção precoce possa apresentar-se acelular ou com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; a pressão líquórica pode estar elevada, os níveis de glicose estão normais ou levemente diminuídos, a proteína está levemente aumentada, entre 50 a 200 mg/dL, os testes de antígenos bacterianos são negativos, a concentração de imunoglobulinas se apresenta aumentada e bandas oligoclonais podem estar presentes.

A soroconversão, com a demonstração de um aumento de quatro vezes ou mais, no título de anticorpos entre o soro agudo e o convalescente, é útil no diagnóstico de pacientes imunocompetentes. A pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM contra o vírus é um diagnóstico mais rápido e específico (38).

Os estudos de imagem como ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada do cérebro (TCC) não costumam serem suficientemente específicos (104).

A triagem do LCR pela PCR tem se tornado uma ferramenta diagnóstica importante na detecção de diversos microrganismos, principalmente pela sua rapidez (93). A principal vantagem da PCR é a sua grande capacidade de amplificar quantidades diminutas de moléculas de DNA alvo e produzir grandes concentrações do material genético desejado, que podem ser visualizados por intermédio de procedimentos comuns

de laboratório (23). Assim, sendo uma técnica muito adequada para o uso no diagnóstico de doenças infecciosas do SNC, empregando o LCR, material onde normalmente, os patógenos se encontram em baixas concentrações.

Encefalites virais

As encefalites virais se caracterizam por um processo inflamatório agudo do cérebro provocado por infecção viral direta ou hipersensibilidade iniciada por um vírus ou por outra proteína estranha. São menos freqüentes que as meningites, porém apresentam um maior potencial de gravidade. As encefalites podem representar uma manifestação primária ou uma complicação secundária de uma infecção viral.

Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da encefalite viral é baseado nos resultados do líquido, como nos da meningite viral. Normalmente, os achados laboratoriais não são muito elucidativos, e os testes sorológicos específicos disponíveis oferecem um diagnóstico retrospectivo. Os métodos moleculares são rápidos e sensíveis para a detecção viral, e em algumas etiologias, já estão sendo considerados os testes de escolha, como na encefalite herpética, onde a biópsia cerebral já foi suplantada pela PCR (113). O emprego de técnicas de neuroimagem em combinação como a PCR podem descartar a biópsia cerebral em algumas situações de doenças focais do SNC (104).

Fatores predisponentes das meningites e encefalites virais

Embora a grande maioria dos indivíduos com meningites ou encefalites careça de fatores predisponentes, encontramos uma maior predisposição às infecções virais raras e graves do SNC nos pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida (30).

Pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e SIDA

Desde a sua identificação em 1981, a infecção pelo HIV e a SIDA progrediram em proporções globais. Com as campanhas de prevenção e o advento das potentes drogas antiretrovirais, a prevalência das infecções no estágio final da doença tem diminuído nos Estados Unidos e oeste da Europa. No entanto, o espectro da doença nos países pobres, como a África, a China e a Índia, se apresenta como um dos maiores desafios para a medicina. As terapias antiretrovirais altamente ativas (HAART) continuam a se expandir com novas classes de fármacos sendo implementadas. A introdução das HAART tem transformado uma doença infecciosa, quase que uniformemente fatal, em uma síndrome que na maioria dos casos, pode ser manejada como uma patologia crônica (60).

A SIDA tem sido definida como a ocorrência de infecções oportunistas com risco de vida, malignidades, doenças neurológicas e outras patologias específicas em pacientes com infecção pelo HIV e/ou com contagem de células CD4 inferior a 350 mm^3 . Após a infecção primária, os estágios do HIV são arbitrariamente classificados pela contagem das células CD4; sendo que o estágio assintomático apresenta uma contagem de CD4 maior que 500 mm^3 , o estágio intermediário corresponde a valores de CD4 entre 200 a 500 mm^3 e o estágio avançado da doença mostra uma contagem de CD4 inferior a 100 mm^3 . Na fase intermediária da doença, o paciente pode desenvolver sintomas como febre, linfadenopatias e mal estar que podem ser atribuídos às infecções sistêmicas como tuberculose, micose ou linfoma. Episódios esporádicos de herpes zoster, dermatite seborréica, infecções bacterianas como pneumonias, sinusite e bronquite, e infecções na pele e nas unhas são comuns durante este estágio. Na fase avançada da doença, o paciente apresenta um quadro com uma série de infecções oportunistas conhecido como SIDA. A pneumonia progressiva, o abscesso cerebral, a meningite crônica e a demência são patologias presentes nesta fase da doença. A infecção por *Pneumocystis carinii* é freqüente neste estágio, assim como a disseminação de micoses sistêmicas, especialmente para o SNC. Com o avanço da doença a contagem de CD4 cai abaixo de

50 células/ μ L, surgindo novas infecções oportunistas, como retinite por CMV, e malignidades como linfoma não Hodgkin e sarcoma de Kaposi. Infecções do SNC por *Toxoplasma gondii*, meningite por criptococcus, doença por CMV e leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) podem estar presentes. Infecções por CMV, micobactérias do complexo *avium*, *Strongyloides stercoralis*, herpes zoster ou tuberculose, que são normalmente limitadas a um órgão ou sistema, podem invadir tecidos. Infecções clinicamente importantes por mais de um patógeno se tornam evento comum (83).

Na ausência de tratamento adequado, estes pacientes progridem rapidamente para o óbito. Entretanto, nos últimos anos, com o aparecimento das novas drogas antiretrovirais, que atuam em diferentes estágios da replicação viral, promovendo a queda ou desaparecimento do vírus da circulação, tem se conseguido melhorar o sistema imune dos pacientes com infecção pelo HIV, alterando de modo significativo seu prognóstico. No entanto, a HAART está longe de ser o tratamento ideal. Estas terapias não conseguem eliminar o vírus de alguns reservatórios celulares e anatômicos do organismo, como linfonodos, baço e SNC (102). Cada droga possui efeitos colaterais e a combinação delas pode ser debilitante. Alguns efeitos adversos da terapia combinada como hepatite fulminante, lipodistrofia e toxicidade mitocondrial são irreversíveis, e como no caso dos antimicrobianos, isolados resistentes continuam a surgir. A HAART continua a se expandir quase que exponencialmente, assim aparecendo um novo grupo de síndromes associadas com a sobrevida prolongada destes pacientes (111).

Diagnóstico das meningites e encefalites assépticas

O diagnóstico das infecções do SNC está apoiado no tripé: clínica, epidemiologia e exames complementares. Os métodos por imagem como a ressonância nuclear magnética, além da análise do líquido, são de grande importância, embora raramente sirvam para a confirmação da etiologia.

As meningites e encefalites assépticas são os processos inflamatórios que mais comumente afetam o sistema nervoso central. Geralmente são de etiologia viral, mas em imunodeficientes, freqüentemente o *Toxoplasma gondii* e as micobactérias são agentes causais. Os métodos diagnósticos convencionais como cultura, pesquisa de anticorpos específicos, microscopia eletrônica e detecção de antígenos são demoradas e pouco sensíveis, não auxiliando muito no diagnóstico e tratamento do paciente na fase aguda da doença (5,59). O exame do LCR faz parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com suspeita de infecções do SNC, e na maioria das vezes, é a maneira de se obter o diagnóstico etiológico.

Cultura viral

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que necessitam da célula para a produção de energia e síntese protéica. Portanto, a partícula viral pode ser vista como uma organela extracelular especializada na transferência de ácido nucléico de uma célula à outra. O isolamento do agente etiológico de uma síndrome viral em cultura de tecido é o padrão ouro para este diagnóstico. Existem três fontes comerciais de cultura celular: células renais, embrionárias e pulmonares. Estas são mantidas em frascos e imersas em meio de cultura. Antes de inocular a amostra (0,2 a 0,3 mL), o meio de cultura é removido para que aconteça uma eficiente adsorção do vírus sobre a linhagem celular. Após a inoculação, deixa-se o frasco em agitação durante 1 hora a 37 °C. A camada de células é lavada com uma solução salina balanceada e um novo meio de cultura é adicionado. O frasco é mantido entre 35 a 37°C, com trocas do meio de cultura a cada 7-15 dias. O crescimento de um vírus é indicado pela presença de efeitos citopáticos específicos na linhagem celular após determinados períodos de incubação (38).

“Shell vial Assay” é um método modificado da cultura celular convencional. A amostra é colocada sobre uma monocamada celular mantida sobre uma lamínula e

centrifugada por 30 minutos a 6000 rpm entre a 35 a 37°C, em solução de Hanks, seguida por uma incubação de 16 a 48 horas em estufa, na mesma temperatura, dependendo do tipo de vírus pesquisado. Após, sofrer lavagens e fixação com acetona, a lamínula é colocada sobre uma lâmina de microscópio. Na camada de células sobre a lamínula é realizada uma reação de imunofluorescência com adição de anticorpos monoclonais e conjugados vírus específicos, com incubações e lavagens intercaladas. Ao microscópio de fluorescência os resultados positivos apresentarão um típico padrão de fluorescência nuclear. A vantagem desta técnica é a sua grande velocidade, mas não é adequada para todos os vírus, sendo sempre menos sensível que a técnica convencional de cultura (38).

Detecção de antígenos

A detecção de antígenos virais, que é baseada na reação antígeno-anticorpo, emprega anticorpos específicos virais marcados. Na imunofluorescência direta (IFD), a amostra clínica é colocada sobre uma lâmina, sob a forma de esfregaços, que são secos e fixados. O anticorpo específico marcado com fluoresceína (conjugado) se ligará ao antígeno intracelular fixado na lâmina e, após remoção do conjugado não ligante por lavagens, a fluorescência é visualizada em microscópio com iluminação ultravioleta. Na reação de enzima imunoensaio (EIE), a enzima peroxidase ou fosfatase alcalina faz parte do conjugado. Este método tem maior sensibilidade quando as amostras possuem muitas células, já que são baseados na detecção das características do padrão de coloração do antígeno viral intracelular (38).

Microscopia eletrônica

É um método não empregado como rotina diagnóstica viral, mas é útil para vírus não cultiváveis ou ainda não conhecidos. A morfologia do vírus é, muitas vezes,

suficiente para classificá-lo corretamente. A maior limitação deste método é sua baixa sensibilidade, pois a amostra deve ter no mínimo 10 virions/mL para resultar positiva (38).

Testes sorológicos

Os testes sorológicos baseiam-se na resposta humoral do paciente e são os testes de escolha para a detecção de vírus que não crescem em culturas celulares convencionais. Os anticorpos IgM são detectados entre o terceiro e quinto dia após o estabelecimento da doença e podem persistir por alguns meses. Os anticorpos da classe IgG aparecem alguns dias após, e na maioria das viroses, ficam detectáveis por toda a vida (38).

Enzima imunoensaio é o termo geral para uma série de testes que permitem a análise tanto de antígeno quanto de anticorpo. Existe uma série de procedimentos tanto manuais como automatizados baseados na reação antígeno anticorpo, que utilizam diferentes substratos e enzimas para detectar o produto final da reação. Exemplos de testes de EIE são Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa), IgM antibody capture ELISA (MAC ELISA) e Microparticle enzyme immunoassay (MEIA).

Elisa indireto é um teste sensível e heterogêneo, onde se utiliza uma fase sólida. Esta fase sólida pode ser um tubo, um orifício de microplaca ou uma pérola recoberta pelo antígeno, que irá reagir com anticorpos específicos. Após a adição da amostra do paciente, do conjugado enzimático e do substrato, o complexo antígeno-anticorpo será detectado pela mudança de cor do substrato provocada pela reação enzimática. Suas desvantagens estão na espera do aumento de anticorpos IgG entre 2 amostras pareadas (38) e na sua aplicação limitada em pacientes imunocomprometidos.

Testes moleculares

Hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA empregando sondas específicas. As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos de DNA ou RNA que se deseja detectar. As sondas podem estar associadas a moléculas radioativas, fluorescentes ou biotinizadas para que se possa visualizar a reação com o material genético em estudo. É uma técnica empregada, principalmente, para a detecção de vírus e outros agentes infecciosos em tecidos suspeitos (107).

DNA ramificado (b-DNA) é baseado na amplificação do sinal onde o analito é detectado por quimioluminescência. A reação ocorre em placas de microtitulação recobertas com sondas de captura complementares às sondas alvo que hibridizarão com o RNA da amostra. As sondas alvo também possuem uma região complementar para a ligação de um pré-amplificador onde se ligarão as sondas b-DNA que possuem complementaridade com as sondas marcadas com fosfatase alcalina. Após a adição do substrato específico, ocorre a ação enzimática e o produto final é lido em um quimioluminômetro (38).

Na reação em cadeia da ligase (RCL) a enzima DNA ligase catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster em um pequeno espaço formado pelo anelamento de dois oligonucleotídeos sobre uma seqüência alvo de DNA. Semelhante a PCR, a amplificação é realizada através de ciclos repetidos. Um ciclo de ligação completa compreende três passos: adenilação da enzima, adenilação do substrato e fechamento do espaço. A RCL tem sido empregada na detecção de bactérias e patógenos virais (16).

Microarrays também denominados *chips* de DNA/RNA são arranjos de clones de cDNA, ou conjunto de oligonucleotídeos sintéticos, depositados sobre uma superfície sólida que pode ser uma membrana de vidro ou *chips* de sílica. A montagem da placa é realizada por um robô que deposita micro quantidades do material genético sobre a matriz, de maneira ordenada. Este processo organiza um grande número de amostras,

preparando-as de maneira que possam hibridizar com sua seqüência complementar. A técnica de *microarray* é baseada na hibridização de ácidos nucléicos do paciente, que é marcado radiativamente ou com fluorocromo, com o material genético que está imobilizado sobre a matriz. Existem também as sondas controle, que são marcadas com fluorescência de cor diferente. Estas sondas são aplicadas ao *microarray* simultaneamente, e após um período de incubação, as moléculas livres são removidas por lavagem. Por fim, cada elemento presente no *array* é lido por um *scanner* a laser, reportando intensidade de fluorescência. Esta tecnologia possibilita a análise simultânea de um grande número de seqüências de DNA (40). Este procedimento tem sido aplicado em doenças infecciosas, na identificação de espécies de micobactérias e na detecção de mutações que conferem resistência à rifampicina (42). Sua aplicação também é adequada para detectar e subtipar centenas de vírus em amostras respiratórias, sem o uso de seqüências específicas ou *primers* degenerados, em um simples ensaio, apenas com uma prévia amplificação de PCR (110).

Na última década, as técnicas de amplificação de ácido nucléico, em especial a PCR, transformaram o diagnóstico das infecções, principalmente em neurovirologia, devido a sua elevada sensibilidade (39). O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) pelo bioquímico Kary Mullis e colegas, em meados de 1980, além de lhe conferir o prêmio Nobel em química no ano de 1993, revolucionou a análise de ácidos nucléicos, permitindo a amplificação *in vitro* de seqüências específicas do material genético (78).

A PCR baseia-se no mecanismo natural da duplicação do material genético que ocorre sempre que uma célula se divide para formar duas novas. A reação ocorre em tubo de ensaio contendo o DNA alvo a ser amplificado, os iniciadores, oligonucleotídeos ou *primers* que são fragmentos sintéticos de fita simples de DNA, complementares à seqüência do DNA pesquisado, deoxinucleotídeos trifosfato, enzima termoestável DNA polimerase e soluções tampão. A reação acontece em um equipamento chamado termociclador e consiste de um ciclo com três etapas onde as temperaturas de incubação

variam. Na 1ª etapa a temperatura da reação atinge entre 90-95 °C, ocorrendo a desnaturação da fita dupla de DNA, na 2ª etapa a temperatura baixa em torno de 40-65 °C permitindo a hibridização dos iniciadores e na 3ª etapa, a temperatura é elevada a 72 °C, acontecendo a extensão dos *primers* promovida pela enzima Taq polimerase, que forma fitas sintéticas idênticas ao segmento alvo. Este ciclo de três etapas é repetido por muitas vezes e os fragmentos de DNA recém formados, servem de molde para a síntese de novas fitas. A reação é exponencial, o número de fragmentos de DNA se duplica a cada ciclo e, após 30 ciclos, teremos mais de um milhão de cópias, o que torna esta técnica extremamente sensível (36, 78).

A utilização da PCR no diagnóstico microbiológico, além de amplificar o DNA do agente causal da infecção diretamente da amostra, oferece a possibilidade de tipar o microrganismo, fornecer dados sobre a patogênese, epidemiologia e tratamento da doença. Pode-se ainda monitorar o tratamento pela quantificação do patógeno e detectar mutações que conferem resistência às drogas, por amplificar seqüências distintas do genoma (8, 36, 69). Seus resultados devem ser avaliados em conjunto com as técnicas tradicionais de laboratório até que um grande número de questões, incluindo o verdadeiro significado de um resultado de PCR e seu custo associado, sejam mais bem entendidos.

A PCR tem sido muito estudada para o diagnóstico das infecções do SNC em pacientes com infecção pelo HIV (1, 2, 6, 9, 11, 12, 19, 20, 23-29, 43, 44, 51, 55, 56, 90, 118).

O SNC pode ser infectado pelo próprio HIV ou por agentes oportunistas, resultando em sérias morbidades tais como distúrbios motores e comportamentais, meningites ou encefalites. Técnicas convencionais são inadequadas para o diagnóstico da maioria das doenças do SNC relacionadas à SIDA e a aplicação da PCR tem possibilitado o diagnóstico precoce nestes pacientes, auxiliando a diferenciar as lesões causadas pelo próprio HIV daquelas causadas por agentes oportunistas como o JCV e o CMV (26, 113).

Embora a incidência de infecções oportunistas do SNC, em pacientes HIV positivos, tenha sofrido um declínio em países desenvolvidos após o surgimento das terapias antivirais altamente ativas, elas ainda representam um dos maiores desafios diagnóstico e terapêutico em todo o mundo (21).

Os patógenos oportunistas e seu diagnóstico por PCR

Citomegalovírus

O Citomegalovírus faz parte da família *Herpesviridae*, que inclui o EBV, HSV 1 e 2, HZV e os herpesvírus humanos tipos 6, 7 e 8. O CMV pertence à subfamília *betaherpesvirinae*, juntamente com os herpesvírus tipos 6 e 7. É um vírus de genoma DNA que possui fita dupla com 230 Kb (46).

Apesar do significativo progresso na década passada, nosso conhecimento sobre a história natural do CMV, particularmente sua latência, os mecanismos biológicos de sua reativação e sua interação com o hospedeiro continua incompleto, permanecendo muitas lacunas quanto ao diagnóstico e tratamento (31).

A infecção por CMV é uma das mais sérias complicações em pacientes infectados pelo HIV com valores de linfócitos T CD4+ inferior a 50 células/ μ L, podendo comprometer o sistema nervoso causando encefalite, mielite, poliradiculite e neuropatias multifocais (72). O diagnóstico é dificultado pela pouca sensibilidade e demora da cultura viral e pelo comprometimento da resposta humoral do paciente, pois muitos pacientes não fazem resposta com anticorpos IgM. O aparecimento dos anticorpos IgM pode estar associado com a reativação do vírus latente, podendo alguns pacientes apresentar IgM na circulação por até um ano após adquirirem a infecção por CMV (31).

A apresentação clínica de muitas encefalopatias causadas pelo CMV, os achados radiográficos e os exames líquóricos de rotina podem ser inespecíficos, sendo que o diagnóstico definitivo exige a identificação do DNA do vírus no cérebro ou no LCR (72).

O estudo de Achim et al. (2) concluiu que, embora a PCR tenha sido sensível em detectar CMV em LCR *post-mortem* de pacientes com SIDA, este ensaio não mostrou sensibilidade para a infecção sintomática do SNC.

Gozlan et al. avaliaram o valor preditivo do critério clínico e do ensaio da PCR para o diagnóstico das doenças neurológicas relacionadas ao CMV em pacientes com SIDA. Estes resultados foram correlacionados com o diagnóstico definitivo baseado na histologia do SNC, no desfecho clínico ou na cultura viral. Houve 61% de concordância entre a tentativa e o diagnóstico real, enquanto o método molecular mostrou uma sensibilidade e especificidade de 92% e 94%, respectivamente (43).

Publicações de protocolos de PCR para a pesquisa do CMV no LCR têm revelado resultados confiáveis para o diagnóstico *in vivo* de lesões do SNC relacionadas ao CMV, com uma sensibilidade e especificidade em torno de 80 e 100% respectivamente (27, 28, 44, 118).

Protocolos usando transcriptase reversa e PCR para pesquisar o RNA mensageiro do CMV, que é expresso somente na fase replicativa, foram desenvolvidos para detectar pacientes com risco de desenvolver infecção sintomática. Estes ensaios usam como seqüência alvo o mRNA (RNA mensageiro) e são menos sensíveis que os outros protocolos, mas apresentam alta especificidade para o diagnóstico da doença por CMV (46).

A técnica de PCR trouxe novas perspectivas para o diagnóstico das infecções do SNC, permitindo o diagnóstico rápido, atitudes terapêuticas precoces e monitoramento adequado. Por ser um vírus latente e a técnica de PCR ser muito sensível, um resultado positivo não necessariamente significa infecção, sendo de fundamental importância a correlação clínica (2).

Nas complicações do SNC, a detecção do CMV já está sendo baseada na pesquisa do LCR por PCR qualitativa. A PCR quantitativa é utilizada no formato de kit comercial, para estabelecer a extensão das lesões do SNC e monitorar a eficácia do tratamento antiviral (25).

Epstein-Barr vírus

É um vírus de genoma DNA, de fita dupla, que mede 172 Kpb. Pode apresentar-se na forma linear como virion maduro ou na forma circular como vírus latente em linfócitos B infectados, que possuem receptores para EBV, o CD21, que é receptor de complemento. Este vírus é o agente etiológico da mononucleose infecciosa, uma doença linfoproliferativa limitada, que pode apresentar uma sintomatologia leve ou severa. A transmissão se dá pela saliva, e muito provavelmente, pelo contato sexual (65). EBV está ocasionalmente associado com síndromes neurológicas como encefalites, mielites transversas e Guillain Barré (48).

Em pacientes com a imunidade comprometida o EBV está associado com uma série de doenças linfoproliferativas desde hiperplasias policlonais benignas até linfomas malignos (66).

Pacientes nos estágios mais avançados da SIDA apresentam risco alto de desenvolver linfoma primário do SNC (LPSNC) (24). O LCR de pacientes com SIDA foi avaliado pela PCR para o diagnóstico da LPSNC. Os resultados mostraram que o DNA do EBV é um marcador tumoral menos invasivo que a biópsia cerebral, com sensibilidade entre 80% e 100% e especificidade entre 94 e 100% (20, 24, 34). Oscilações nos valores da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de diferentes estudos estão na dependência da localização e do tamanho do tumor, além do tipo de protocolo de PCR empregado (48)

A PCR tem suplantado outros procedimentos pela sua eficácia no diagnóstico laboratorial do EBV. Em virtude da natureza persistente da infecção pelo EBV e da extrema sensibilidade da PCR, o DNA viral pode ser detectado no LCR de pacientes assintomáticos, tornando difícil a interpretação dos resultados. Em pacientes imunocompetentes o DNA pode ser amplificado na encefalite por EBV, mas a especificidade associada à doença não é 100% (106). Isto pode ser explicado pela passagem de linfócitos com vírus latente através da barreira hematoencefálica

comprometida, mas também pode ser uma reativação do EBV no SNC detectada precocemente (22).

Na SIDA, o DNA do EBV tem sido encontrado no LCR de pacientes apresentando outras complicações neurológicas (6, 28), enfatizando a necessidade de uma interpretação atenta destes achados que são consequência da extrema sensibilidade dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos. Métodos moleculares quantitativos podem auxiliar a diferenciar a infecção clínica significativa pela replicação do microrganismo, através da carga viral, daqueles achados acidentais (22). Assim, o clínico poderá dispor de uma ferramenta laboratorial com mais confiabilidade para prever, diagnosticar e acompanhar a doença associada ao EBV nestes pacientes.

Herpes simplex vírus tipos 1 e 2

O HSV é um vírus de genoma DNA de fita dupla, com um virion medindo entre 120 a 300 nm de diâmetro. Os genomas do vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) com 152 Kbp e do herpes simples tipo 2 (HSV-2) com 155 Kbp compartilham 83 % de identidade em nucleotídeos dentro de suas regiões codificadoras de proteínas. Embora significativas seqüências genômicas estejam presentes nos dois isolados, estes podem ser identificados por digestão com endonucleases de restrição (95) ou pela PCR, com sondas específicas.

As infecções por HSV ocorrem mundialmente, sem distribuição sazonal e o contágio ocorre através de contato direto com secreções. A maioria das infecções primárias por HSV-1 é adquirida na infância como uma infecção subclínica ou despercebida, sendo que a prevalência aumenta até atingir a fase adulta, chegando em torno de 80% (80).

A infecção primária por HSV-2 se apresenta como herpes genital, com vesículas bilaterais, febre, linfadenopatia inguinal e disúria, mas infecções primárias subclínicas ou não reconhecidas são comuns. Após a infecção primária com HSV-1 ou HSV-2 ocorre um

período de latência nos gânglios da raiz dorsal, podendo ocorrer reativação da infecção (49).

A encefalite herpética apresenta febre, mudanças de comportamento e alteração de consciência com envolvimento localizado do lóbulo temporal. Sem terapia adequada, a mortalidade é superior a 70%, e entre os pacientes que sobrevivem, poucos recuperam suas funções neurológicas normais (49). É uma doença com alta morbidade e mortalidade, sendo seu prognóstico influenciado pela precocidade do diagnóstico e tratamento adequado (103).

Meningites esporádicas ou recorrentes (síndrome de Mollaret) caracterizadas por febre, fotofobia e linfocitose podem apresentar-se após uma infecção genital por HSV. Tais eventos são limitados e normalmente se resolvem em uma semana. O HSV também pode estar associado a mielites, radiculites, paralisias ascendentes e de Bell (49). Indivíduos com defeito na imunidade celular normalmente desenvolvem infecções sintomáticas mais severas por HSV. Nestes pacientes, o vírus pode disseminar-se por vários órgãos, causando meningoencefalite, pneumonite, hepatite e coagulopatias (49).

Os procedimentos de diagnóstico laboratoriais como detecção de antígenos e anticorpos específicos ou técnicas de imagens como tomografia computadorizada, eletroencefalograma e ressonância magnética, podem auxiliar o clínico, mas seus resultados carecem de sensibilidade e especificidade para um diagnóstico definitivo da infecção do SNC por HSV. O isolamento viral em cultura de biópsia cerebral tem sido considerado o padrão ouro para este diagnóstico, por apresentar 100% de sensibilidade e especificidade, mas é pouco usado por sua natureza invasiva. A cultura viral do LCR é pouco sensível, como documenta um trabalho que registra apenas 4% de positividade cultural no LCR de pacientes, cujas biópsias comprovaram encefalite por HSV (103).

No início da década de 90 são publicados os dois primeiros ensaios de PCR para a detecção de DNA em amostras de LCR de pacientes com encefalite viral por HSV (89, 96). A utilização deste método molecular para o diagnóstico da encefalite herpética tem sido avaliada por muitos pesquisadores (45, 59, 91, 92, 93). Estudos comparando a

PCR com o padrão ouro da cultura viral ou detecção de antígenos específicos após biópsia cerebral tem demonstrado que a PCR é altamente sensível e específica para o rápido diagnóstico da encefalite herpética, podendo ser positiva após o primeiro dia do início da doença (56). A PCR tem amplificado DNA do HSV no LCR de pacientes com síndromes atípicas como a de Mollaret, mostrando que o HSV, em especial o HSV-2 está implicado na maioria destas meningites recorrentes, mesmo na ausência de lesões de pele ou dos genitais (34).

A detecção do DNA viral no LCR pela PCR, com igual ou maior sensibilidade que a biópsia cerebral, tem se tornado o método de escolha para o diagnóstico da encefalite herpética (45, 59).

Varicella-zoster vírus

O vírus da varicella zoster é classificado como um alfa herpesvírus e possui genoma DNA de fita dupla com aproximadamente 125 Kpb. Varicela e zoster são duas manifestações clínicas diferentes causadas pelo mesmo agente. A varicela é uma infecção primária pelo HZV, enquanto o zoster é uma infecção secundária resultante da reativação do vírus latente nos gânglios sensoriais (41).

A meningite asséptica é um evento ocasional da infecção por VZV, especialmente em pacientes com a imunidade celular comprometida. A amplificação do DNA do HZV no LCR de pacientes imunocompetentes tem mostrado evidências de meningite asséptica na ausência de lesões de pele ou dor no dermatomo (34). Estes achados sugerem que o HZV pode infectar o SNC, pela reativação do vírus nos gânglios infectados.

Nos pacientes com infecção pelo HIV, a disseminação do HZV e as infecções do SNC podem representar complicações severas tais como: leucoencefalite multifocal, ventriculite, meningiomieloradiculite, mielite e vasculopatias (23).

Cinque et al. comprovaram que, em pacientes com HIV, a PCR no LCR pode detectar infecções no SNC por HZV tanto com manifestações neurológicas associadas ao

vírus como na forma de reativação subclínica da infecção. Neste mesmo estudo, mais de dois terços dos pacientes com DNA de HZV no LCR apresentavam achados radiológicos e clínicos sugestivos de infecção causadas por outros agentes (23).

O diagnóstico precoce do HZV pela PCR possibilita um maior sucesso terapêutico contrastando com a dificuldade da cultura viral, mas resta elucidar se o DNA do HZV presente no LCR de pacientes com outras doenças do SNC poderá desenvolver complicações neurológicas futuras.

Herpesvírus humano tipo 6

O Herpes humano tipo 6 foi isolado em 1986 por Salahuddin et al., de uma cultura de linfócitos de um paciente com linfoma não Hodgkin e SIDA (99). Estudos moleculares posteriores demonstraram que o HHV-6 possui dois subgrupos maiores, designados como variantes A e B, e exibem significativas diferenças a níveis molecular e imunológico. É um vírus de genoma DNA e tem como receptor de superfície celular o CD46 (86).

A infecção primária, o exantema súbito, ocorre cedo na infância, com manifestações clínicas caracterizadas por febre alta de curta duração, erupções cutâneas generalizadas e granulocitopenia. A infecção primária em adultos é rara, mas pode ser grave. Em indivíduos imunocompetentes, o vírus se mantém latente nos linfócitos, mas sob condições de imunossupressão, como na SIDA, o vírus pode reativar provocando doença (86).

Publicações têm reportado a possível associação da infecção ou reativação do HHV-6 com algumas doenças como: linfadenopatia persistente, síndrome da fadiga crônica, desordens autoimunes, síndrome semelhante à mononucleose infecciosa, encefalites, PML, neoplasias como a doença de Hodgkin, esclerose múltipla e alguns casos da síndrome de Rosai-Dorfman (11, 86). A maioria destas doenças está associada com algum grau de imunodeficiência.

O HHV-6 e o HIV-1 infectam e replicam nas células T CD4+ e muitos estudos tem examinado essas interações. Alguns pesquisadores estão estudando o possível papel do HHV6 em provocar doenças em pacientes HIV positivos, sozinho ou associado ao CMV, e também a hipótese de que o HHV-6 acelera a progressão para SIDA (11, 56, 57).

O vírus pode ser isolado em meios de cultura altamente sofisticados, através do acompanhamento do efeito citopático sobre as células de cultivo e o HHV-6 deve ser confirmado com o emprego de anticorpos monoclonais específicos através da imunofluorescência direta ou da PCR (86).

Os testes sorológicos disponíveis pesquisam imunoglobulinas G e M, mas não identificam as variantes A e B. Estes testes, além de terem pouco significado em pacientes imunocomprometidos, podem apresentar reação cruzada entre o HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e CMV, em virtude das similaridades genéticas entre estes herpesvírus (86).

A PCR é útil na detecção do DNA do HHV-6 devido a sua sensibilidade, pois mesmo durante a infecção ativa, a concentração do vírus pode estar muito baixa. Embora, muitos protocolos de PCR têm sido publicados utilizando diferentes alvos genômicos para a amplificação, nenhum procedimento de consenso tem emergido. A lista de métodos utilizando a PCR inclui o PCR simples, o *nested* PCR, ensaios qualitativos e quantitativos, além de métodos que empregam alvos DNA ou RNA mensageiro. As variantes A e B podem ser identificadas por PCR empregando *primers* específicos, pela análise do produto amplificado por meio de hibridização com sondas específicas, pela digestão com endonucleases de restrição ou pelo seqüenciamento (86).

Alguns métodos de PCR utilizando *primers* de HHV-6 como componente de um multiplex têm sido desenvolvidos. Isto possibilita a análise simultânea, em um único tubo, de dois a seis agentes herpesvírus, comumente envolvidos em doenças com sintomas indistinguíveis em pacientes com SIDA (58, 75, 90, 91).

O desenvolvimento de protocolos de PCR mais refinados poderá melhorar o entendimento da associação entre a doença neurológica presente e o HHV-6, assim como o significado da coinfeção com o CMV.

JC vírus

O vírus JC, juntamente com o vírus BK, pertencem à família *Polyomaviridae* e possuem genoma DNA de fita dupla. O JCV foi isolado em 1971 do cérebro de um paciente, com linfoma de Hodgkin que apresentava leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), doença fatal desmielinizante (84).

A infecção primária ocorre cedo na infância, entre os 5 e 8 anos, com sintomas leves e inespecíficos com posterior aparecimento dos anticorpos que podem persistir durante toda a vida. Em pacientes imunocompetentes, evidências sugerem que o vírus pode permanecer latente em sítios como rins e células do sistema linfóide, sem causar infecção ativa (71).

Apesar do reconhecido tropismo do vírus por tipos específicos de neurônios, a infecção pelo JCV ainda não é totalmente entendida. Sabe-se que a imunossupressão tem papel importante na reativação do JCV, a partir de seus sítios latentes externos, e que o vírus alcança o SNC infectando os oligodendrócitos. Os núcleos destas células são envolvidos pelas partículas virais, produzindo inclusões intranucleares e resultando em perda da bainha de mielina do SNC (108).

Pacientes com infecção pelo HIV representam aproximadamente 85% de todos os casos de LMP e, em torno de 5% dos pacientes com SIDA desenvolvem a doença. É uma doença de evolução lenta, e os sintomas, dependendo da localização das lesões, se apresentam como hemiparesia ou disfunção motora, demência progressiva ou defeitos cognitivos, fraqueza e problemas visuais. A LMP afeta, predominantemente, os hemisférios cerebrais, mas em torno de um terço dos pacientes não apresentam lesões

cerebelares e um pequeno subgrupo apresenta lesões, predominantemente ou exclusivamente, confinadas ao cerebelo (108).

A cultura do JCV de amostras clínicas não é um procedimento de rotina, mesmo em laboratórios especializados em virologia, devido à exigência de substratos celulares restritos, ao seu crescimento muito lento e pela necessidade de múltiplas sementeiras até que o vírus possa ser detectado (71).

O diagnóstico da LMP pode ser sugerido pelos sintomas clínicos e pela presença de lesões na substância branca vistas na tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética. Mas, o diagnóstico definitivo requer a biópsia cerebral para a demonstração de lesões características, associada à detecção do DNA ou antígeno do JCV no cérebro através de técnicas de imuno-histoquímica, hibridização *in situ*, imunofluorescência ou PCR (71).

A encefalopatia causada pelo próprio HIV, bem como outras leucoencefalopatias associadas à SIDA, muitas vezes não são diferenciadas da LMP apenas com base nos diagnósticos de imagem do cérebro. Devido à pobre resposta aos tratamentos disponíveis e à falta de uma droga específica, o custo-benefício de um procedimento diagnóstico invasivo é, normalmente, desfavorável (32).

Um estudo de 1995 detectou pela técnica de PCR, a presença do vírus JC no líquido em 17 de 23 pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva, com uma sensibilidade e especificidade de 74% e 95,8% respectivamente (37). A baixa sensibilidade de 74% se correlaciona com estudos anteriores na detecção de DNA do JCV por PCR (114), demonstrando que resultados negativos por este método não excluem o diagnóstico.

A introdução das terapias antiretrovirais combinadas diminuiu a ocorrência de infecções oportunistas nos pacientes com infecção pelo HIV, mas teve menor impacto na LMP, com pouca remissão da doença após tratamento. A HAART reduz a carga viral do HIV e melhora a imunidade, diminuindo os níveis do JCV no LCR e conseqüentemente os

sintomas da doença. Assim se fazendo necessário um método molecular com alta sensibilidade para diagnosticar e monitorar o DNA do JCV no LCR destes pacientes.(33).

Muitos protocolos têm sido descritos, com diferenças nos métodos de extração da amostra e na escolha da região para a seleção dos *primers* com o objetivo de melhorar a sensibilidade do teste. De Luca et al. (33), desenvolveram um *nested* PCR (PCR duplo) e testaram 184 amostras de LCR de pacientes com infecção avançada pelo HIV e LMP, onde encontraram 90% de sensibilidade e 99% de especificidade. O limite de detecção do *nested* PCR de 2 genomas eq/ μ l aumentou significativamente a sensibilidade diagnóstica do teste. Seus achados indicaram que a concentração viral no LCR é muita baixa, nunca excedendo 50 genomas eq/ μ L, podendo aumentar com a progressão da doença. Os autores salientam a necessidade de uma segunda punção de LCR com um intervalo de uma semana, quando a PCR for negativa e houver forte suspeita de LMP.

O desenvolvimento de métodos moleculares mais sensíveis e específicos para detectar o DNA do JCV, em conjunto com o contexto clínico e os exames de imagem do cérebro, possibilitará um diagnóstico mais rápido, seguro e menos invasivo da LMP, diminuindo a necessidade da biópsia cerebral.

Toxoplasma gondii

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário que infecta a maioria das espécies de animais de sangue quente, inclusive o homem. O gato é o principal reservatório da infecção excretando oocistos. Este parasita intracelular possui três estágios: (a) taquizoítas (trofozoítas) que se multiplicam rapidamente e destroem as células infectadas durante a infecção aguda, (b), bradizoítas se multiplicam no pulmão, músculo esquelético e retina e (c) esporozoítas na forma de oocistos. Os taquizoítas e bradizoítas estão presentes nos tecidos e os oocistos são excretados nas fezes dos gatos. Todos os

estágios do ciclo vital ocorrem nos felinos, mas apenas os estágios de trofozoíta e cistos se apresentam no homem e outros hospedeiros intermediários. A infecção humana pode ser adquirida pela ingestão de carne com pouco cozimento com cistos de *T.gondii*, ingestão de oocistos por contaminação das mãos, água ou alimentos, transplante de órgão, transfusão sanguínea ou transmissão transplacentária.

A infecção toxoplásmica tem distribuição mundial, sendo que a maioria dos casos primários é assintomática, entretanto, alguns pacientes podem apresentar febre e linfadenopatia semelhante à mononucleose infecciosa. A toxoplasmose pode se desenvolver no hospedeiro imunossuprimido como resultado da aquisição da infecção aguda, mas principalmente, pela reativação da infecção latente, em consequência da perda progressiva da imunidade celular (117).

A toxoplasmose cerebral é a infecção oportunista mais freqüente do SNC em pacientes com SIDA, podendo afetar entre 4 a 47 % destes pacientes e se desenvolve quando os níveis dos linfócitos T CD4+ caem abaixo de 100 células/ μ L. O aspecto neuropatológico cerebral predominante é a encefalite necrotizante multifocal que pode comprometer tanto a substância branca como a cinza, mas os achados radiográficos apresentam variações, com 27 a 43% dos pacientes registrando apenas uma única lesão nos estudos de imagem por tomografia computadorizada e ressonância magnética. Em 10% dos pacientes, a encefalite toxoplásmica (ET) pode se apresentar como uma encefalite difusa sem lesões focais visíveis (104).

As manifestações clínicas mais comuns são cefaléia, confusão, febre, letargia e tontura (72). Nestes pacientes, o exame do LCR pode ser normal ou apresentar leve aumento de linfócitos, proteína elevada e eventualmente, glicose baixa. A maioria do pacientes com encefalite por toxoplasma tem evidência sorológica da infecção, mas um resultado positivo isolado no soro não estabelece o diagnóstico da reativação da infecção. Entretanto, um resultado negativo no soro pode excluir o diagnóstico da toxoplasmose, pois, apenas em torno de 3% dos pacientes com SIDA e ET, não apresentam anticorpos contra o *T. gondii* no sangue. A pesquisa de anticorpos IgG contra

o *T. gondii* no LCR pode ser útil quando usada em conjunto no diagnóstico da ET, pois tem sido demonstrada produção local desta imunoglobulina nestes pacientes. Os testes sorológicos mais empregados para a pesquisa de anticorpos contra o *T.gondii* são a imunofluorescência indireta e o enzima imunoensaio (EIE). Testes para a pesquisa de IgM por captura têm se mostrado mais sensíveis que a pesquisa de IgM por imunofluorescência para o diagnóstico de infecção recente. Mas, alguns indivíduos podem apresentar níveis muito baixos ou indetectáveis de anticorpo IgM, e outros podem ter títulos de IgM detectáveis por até dezoito meses após a infecção (117).

A pesquisa de anticorpos por diferentes metodologias é amplamente utilizada, mas sua interpretação muitas vezes é inconclusiva (70), tendo valor limitado nos pacientes com a imunidade comprometida, pois a produção de anticorpos específicos contra o *T. gondii* pode ser mais demorada ou desigual (88). A soroprevalência em pacientes HIV saudáveis, está em torno de 50%, mas um aumento significativo na concentração da imunoglobulina IgG durante a infecção ativa ocorre em apenas 30% destes pacientes e somente 2% demonstram mudança no título dos anticorpos IgM durante a infecção cerebral (117).

O diagnóstico definitivo da ET requer a demonstração de taquizoítas em tecido da biópsia cerebral, mas este procedimento está associado com alta morbidade e mortalidade, além de não ser muito sensível (90).

O diagnóstico presuntivo da encefalite toxoplásmica em pacientes com SIDA é baseado principalmente em uma sintomatologia consistente em pacientes com CD4+ inferior a 200 células/ μ L, nos achados radiológicos característicos, nos anticorpos IgG séricos e na resposta após tratamento empírico específico antitoxoplasma (72).

Um estudo comparando a incidência e os fatores de risco para a ET em pacientes com SIDA antes e durante o uso da terapia antiviral altamente ativa, usando dados de 68 hospitais universitários franceses concluiu que houve um decréscimo de quase 4 vezes na incidência da ET após a introdução dos inibidores da protease. Esta publicação confirma ainda, o papel primário da imunodeficiência na ocorrência desta

encefalite, a eficácia da profilaxia com cotrimoxazole na proteção da ET e o efeito protetivo da nova terapia contra o HIV, restaurando o sistema imune (1).

Mesmo, com a queda da incidência desta encefalite, seu diagnóstico continua a ser um desafio, pela falta de um padrão ouro conveniente. A PCR tem sido estudada e vista como promissora para o diagnóstico da ET por ser um método altamente específico, sensível, rápido e não invasivo (28).

Este método molecular para amplificar DNA do *T. gondii* tem sido empregado no diagnóstico de infecções congênitas, da doença ocular e da ET em pacientes com SIDA, com diferentes graus de sensibilidades. A aplicação mais importante da PCR tem sido no diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, onde tem se mostrado mais sensível para a confirmação da infecção fetal que os métodos de inoculação em rato, cultura celular e detecção de anticorpo IgM no sangue fetal (117).

Estudos usando a PCR para amplificar o *T. gondii*, empregando *primers* da seqüência repetitiva do gene B1, mostraram pouca ou moderada sensibilidade, mas especificidade alta para o diagnóstico da ET (19, 52).

Em um estudo de 1997, Monforte et al. (76) comparando os resultados da biópsia cerebral e da PCR no LCR de pacientes com SIDA no diagnóstico das lesões do SNC, concluíram que a terapia prévia contra o toxoplasma diminui a sensibilidade dos dois procedimentos já que baixa o número dos cistos ou taquizoítas .

Lin et al. (65) em 2000, propuseram um protocolo de PCR em tempo real para a determinação quantitativa do gene B1 do *T. gondii*, muito adequada para testar pacientes com SIDA que não produzem anticorpos do tipo IgM ou não apresentam aumento de IgG.

Joseph et al. (51) desenvolveram um estudo pioneiro usando o padrão ouro que é a inoculação em ratos com *T. gondii*, para otimizar o ensaio de PCR no diagnóstico da ET, usando *primers* da seqüência repetitiva do gene B1 do protozoário. O valor da PCR para o diagnóstico foi avaliado em pacientes com SIDA e com ET confirmadas, examinando o LCR e o soro destes pacientes. As condições do ensaio foram ajustadas

para um limite de detecção de DNA extraído de meio parasita, resultando em um valor preditivo positivo e negativo de 100% e 97%, respectivamente.

Buchbinder et al. (13) em 2003, realizaram um estudo comparativo utilizando PCR em tempo real para avaliar o desempenho dos genes P30 e B1 como alvos na amplificação do *T. gondii*. Os dois protocolos apresentaram igual sensibilidade, detectando entre 10 a 100.0000 genomas equivalentes por ensaio.

A utilização da PCR na identificação do DNA do *Toxoplasma gondii* no LCR tem sido muito estudada e abre novas perspectivas para um diagnóstico definitivo e menos invasivo da encefalite toxoplásmica.

Micobactérias

A tuberculose (TB) é um problema de emergência global, sendo responsável por 3 milhões de óbitos e 8 milhões de casos novos a cada ano e quase um terço da população mundial está infectada com o bacilo. A alta incidência de cepas multirresistentes, a associação entre a tuberculose e a infecção pelo HIV, além de fatores vinculados às mudanças nas condições sócio-econômicas das populações e principalmente, à falta ou abandono de políticas de prevenção e controle da doença são fatores que podem ser responsáveis pelo quadro atual desta infecção (112).

O agente etiológico da TB pulmonar e de outras formas extrapulmonares da doença é o *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo aeróbico, não esporulado e sem motilidade (87).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M. africanum* e *M. microti*) além de outras oitenta espécies, que incluem micobactérias não tuberculosas, patogênicas, oportunistas e não patogênicas pertencem à família *Mycobacteriaceae* (105). Todas micobactérias apresentam alto conteúdo lipídico em sua parede celular, não se corando prontamente pelo método de Gram. O crescimento em

cultura pode ser lento a muito lento, dependendo da espécie, sendo que as colônias podem ser visualizadas após dois dias a oito semanas de incubação (87).

O complexo *M. avium* (MAC) é representado pela *M. avium* e *M. intracellulare*, além de três subespécies de *M. avium* (*M. avium* subsp *paratuberculosis*, *M. avium* subsp *lepraemurium* e *M. avium* subsp *silvaticum*). O MAC tem sido isolado da água, solo, plantas, poeira de casa e alimentos, mas apresenta baixa patogenicidade, podendo colonizar pessoas saudáveis sem provocar doença, sendo a espécie não tuberculosa mais comum. A infecção, normalmente, acontece através das vias respiratória e gastrointestinal, sendo clinicamente importante quando acontece associada à SIDA, pois freqüentemente se apresenta como uma doença disseminada acometendo múltiplos órgãos. Nestes pacientes, a maioria das infecções causadas pelo MAC tem como agente etiológico o *M. avium*, que é a espécie não tuberculosa mais importante. A correta diferenciação entre a *M. avium* e a *M. intracellulare* utilizando apenas métodos fenotípicos tradicionais é dificultada pelas características bioquímicas inertes do MAC, sendo necessário investigações moleculares (18).

A determinação da espécie da micobactéria é fundamental, pois o tratamento difere de acordo com a espécie. A grande diferença entre a *M. tuberculosis* e as outras espécies está na maneira de como se processa o contágio, já que o bacilo da tuberculose é transmitido de pessoa a pessoa, por inalação. Assim, se faz necessário um diagnóstico precoce para iniciar o tratamento, diminuir as seqüelas, a mortalidade e a disseminação da doença (105).

Defeitos na imunidade celular e o baixo nível de imunocompetência são os maiores determinantes para o desenvolvimento da tuberculose.

A meningite tuberculosa é uma das mais severas complicações da TB, podendo ter evolução aguda, causar seqüelas, coma e até óbito. A doença é produzida precocemente pela disseminação hematogênica ou mais tardiamente pela reativação de um foco latente. O início da doença é insidioso e pode apresentar sintomas semelhantes

a outras meningoencefalites e meningites parcialmente tratadas, sendo necessário um alto índice de suspeição para estabelecer um diagnóstico precoce (50).

No Brasil, a meningite tuberculosa é uma doença de notificação compulsória e investigação obrigatória.

A tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser vantajosas, podendo detectar sinais de hipertensão intracraniana e hidrocefalia, exsudados captados por contraste no espaço subaracnóide e tuberculomas. Ao exame do líquido, tem-se hiperproteinorraquia, hipoglicorraquia e pleocitose leve com predomínio de linfócitos, embora no início da doença os polimorfonucleares possam predominar. O procedimento laboratorial bacteriológico inicia pela pesquisa microscópica direta que utiliza a coloração de Ziehl-Nielsen com sensibilidade em torno 10 a 20% (17), não distinguindo a *M. tuberculosis* das outras espécies. O cultivo emprega os meios de cultura tradicionais como o de Löwenstein-Jensen, mas a detecção do crescimento pode ser agilizada com o uso de sistemas de cultura líquidos radiométricos automatizados ou semi-automatizados como o sistema Bactec (112). Contudo, o isolamento da bactéria, a identificação da espécie e o teste de suscetibilidade às drogas podem levar até 8 semanas.

O diagnóstico definitivo da meningite tuberculosa é feito através do isolamento e identificação do bacilo da tuberculose no LCR. Os métodos bacteriológicos convencionais são pouco sensíveis para o diagnóstico precoce devido à natureza paucibacilar do LCR, sendo, muitas vezes, presuntivo, assim tornando a cultura um padrão ouro retrospectivo (17).

Na ausência de um teste diagnóstico rápido e acurado existe um custo substancial relacionado ao isolamento do paciente e ao tratamento empírico desnecessário. Existe a necessidade de um método de detecção rápido, sensível e específico não somente para a detecção da *M. tuberculosis*, mas também para as micobactérias atípicas. No contexto destas limitações, a PCR tem sido muito estudada para a utilização no diagnóstico da meningite tuberculosa. Teoricamente, um simples microrganismo pode ser detectado em

uma amostra clínica, mas na prática, o limite de detecção está entre 10 a 1000 organismos (73).

Tanto *kits* comerciais como técnicas *in house*, tem sido desenvolvidos e aplicados para a detecção e identificação direta das micobactérias. Existem dois kits comerciais de amplificação de ácido nucléico aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para a detecção direta de *M.tuberculosis* em amostras respiratórias, entretanto, estes kits também estão sendo usados para testar diferentes tipos de amostras não respiratórias. Estes testes comerciais devem ser validados *in house* quando forem empregados em amostras que não as respiratórias (105). Os kits aprovados são o *Enhanced Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (E-MTD; GenProbe, San Diego CA) e o *Amplicor Mycobacterium tuberculosis* Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ). Estes testes moleculares podem reduzir, potencialmente, o diagnóstico de semanas para um dia. A acurácia destes testes tem sido exaustivamente avaliada desde o início da década de 90, entretanto, o seu papel exato permanece controverso. Conforme pareceres do CDC (US Centers for Disease Control and Prevention) e da ATS (American Thoracic Society), os testes de amplificação de ácidos nucléicos complementam o diagnóstico da tuberculose, mas não substituem a microscopia e a cultura (85).

Muitos artigos têm sido publicados avaliando a PCR para o diagnóstico da meningite tuberculosa reportando sensibilidade entre 50 a 91% e especificidade entre 95 a 100% (4, 36, 63, 67,73). Oscilações muito amplas nos valores da sensibilidade obtidas em muitos trabalhos podem ser atribuídas às variações nos métodos empregados para o tratamento da amostra e purificação do ácido nucléico, à escolha da seqüência genômica bacteriana para a construção dos oligonucleotídeos (elemento de inserção *IS6110*, proteína *MBP64*, gene *16S rRNA*, elemento repetitivo conservado *TRC4*), ao tipo de amplificação usado (por exemplo, nested PCR) e ao método de detecção do produto amplificado (por exemplo, gel de agarose sem controle posterior de especificidade) (7). Outra limitação para uma correta avaliação da PCR é a falta de um teste diagnóstico

adequado que sirva como padrão ouro, pois a cultura é pouco sensível e o critério clínico pode ser subjetivo (81).

O emprego simultâneo de protocolos com *primers* delimitando regiões diferentes do genoma bacteriano e a utilização de *nested* PCR tem aumentado a sensibilidade da PCR no diagnóstico da meningite tuberculosa. Beije et. (81) propõem o uso de pelo menos dois sistemas de oligonucleotídeos para aumentar a confiabilidade da PCR. Wei CY et al. (115) utilizaram duas versões de *nested* PCR com *primers* derivados da região IS6110 que é específica para o complexo *M.tuberculosis* e da região mtp-40, presente apenas no genoma da *M. tuberculosis*. Além de obterem uma sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, esta combinação de *primers* conseguiu diferenciar a *M. tuberculosis* da *M. bovis*. Narayanan S et al. (81) empregaram *primers* da região TCR4, elemento repetitivo conservado com especificidade para o complexo *M. tuberculosis* e *primers* da região IS6110, para testar o LCR de 67 pacientes com diagnóstico clínico de meningite tuberculosa, resultando em sensibilidades de 86 e 80%, respectivamente.

Os maiores inconvenientes para se obter uma sensibilidade adequada na amplificação do DNA do bacilo da tuberculose são a dificuldade em conseguir uma lise completa da parede bacteriana e a remoção total de inibidores da reação. Com o objetivo de resolver estes problemas, diversas técnicas têm sido descritas para o tratamento da amostra incluindo fervura, agitação com pérolas de vidro, sonicação, uso de clorofórmio, de proteínase K, de chelex, tratamento com resina, além de métodos complexos de extração de DNA (47), tanto *in house* quanto comerciais.

Diferentemente do diagnóstico da encefalite herpética (59), a PCR está longe de ser o teste de escolha para o diagnóstico da meningite tuberculosa. Uma melhor otimização dos protocolos existentes, com a escolha adequada dos *primers*, do método de preparação da amostra, com o uso de controles internos para monitorar inibidores de reação e com cuidados para prevenir a contaminação, a PCR pode se tornar uma ferramenta útil no diagnóstico da meningite tuberculose quando aliada ao contexto clínico e aos achados microbiológicos do exame direto e da cultura.

Objetivos

Geral

Determinar a prevalência, em nosso meio, dos agentes responsáveis pelas meningites e encefalites linfocitárias em pacientes com infecção pelo HIV, usando a PCR.

Específicos

Avaliar a utilidade de um painel de PCR usado como triagem no diagnóstico das meningites e encefalites assépticas neste grupo de pacientes.

Verificar a existência de associação de um PCR positivo no LCR com os sintomas clínicos, com os achados laboratoriais do LCR e com a tomografia computadorizada do cérebro nos pacientes em estudo.

Referências da literatura

1. Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D. Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 2001;33(10):1747-55
2. Achim L, Nagra RM, Wang R, Nelson JA, Wiley CA. Detection of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid autopsy specimens from AIDS patients. *J Infect Dis* 1994;169(3):623-7
3. Adair CV, Gauld RL, Smadel JE. Aseptic meningitis, a disease of diverse etiology: clinical and etiologic studies on 854 cases. *Ann Intern Med* 1953;39:675-704
4. Ahuja GK, Mohan KK, Prasad K, Behari M. Diagnostic criteria of tuberculosis meningitis and their validation. *Tuber Lung Dis* 1994;75(2):149-52
5. Anderson M. Management of cerebral infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(12):1243-58
6. Arribas JR, Clifford DB, Fichtenbaum CJ, Roberts RL, Powderly WG, Storch GA. Detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma. *J Clin Microbiol* 1995;33(6):1580-3
7. Beige J, Lokies J, Schaberg T, Finckh U, Fischer M, Mauch H, Lode H, Köhler B, Rolfs A. Clinical evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1995;33(1):90-5
8. Bell J. The Polimerase chain reaction. *Immunol Today* 1989;10(10):351-5
9. Bestetti A, Pierotti C, Terreni M, Zappa A, Vago L, Lazzarin A, Cinque P. Comparison of three nucleic acid amplification assays of cerebrospinal fluid for diagnosis of cytomegalovirus encephalitis. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):1148-51
10. Bogaerts J, Rouvroy D, Taelma H, Kagame A, Aziz MA, Swine D et al. AIDS-associated cryptococcal meningitis in Rwanda (1983-1992): epidemiologic and diagnostic features. *J Infect* 1999;39(1):32-7

11. Bossolasco S, Marenzi R, Dahl H, Vago L, Terreni R, Broccolo F et Al. Human herpesvirus 6 in cerebrospinal fluid of patients infected with HIV: frequency and clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1999;67:789-92
12. Britton CB, Mesa-Tejada, R, Fenoglio CM, Hays AP, Garvey GG, Miller JR. A new complication of AIDS: thoracic myelitis caused by herpes simplex virus. *Neurology* 1985;35(7):1071-4
13. Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2003;45(4):269-71
14. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27(8):1787-92
15. Cannolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. *Infec Dis clinics Am* 1990;4: 599-612
16. Cao W. Recent developments in ligase-mediated amplification and detection. *Trends in Biotechnol* 2004;22(1):38-44
17. Caws M, Wilson SM, Clough C, Drobniowski F. Role of IS 6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3150-5
18. Chemlal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis*.2003;16(2):77-83
19. Cingolani A, De Luca A, Ammassari A, Murri R, Linzalone A, Grillo R, Antinori A. PCR detection of *Toxoplasma gondii* DNA in CSF for the differential diagnosis of AIDS-related focal brain lesions. *J Med Microbiol* 1996;45:472-6
20. Cingolani A, De Luca A, Larocca LM, Ammassari A, Scerrati M, Antinori A et al. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(5)364-9

21. Cinque P, Bossolasco S, Bestetti A, Sala S, Pierotti C, Lazzarin A. Molecular studies of cerebrospinal fluid in human immunodeficiency virus type 1-associated opportunistic central nervous system disease-an update. *J Neurovirol* 2002;8:122-8
22. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2003;26(1):1-28
23. Cinque P, Bossolasco S, Vago L, Fornara C, Lipari S, Racca S, Lazzarin A, Linde A. Varicella-zoster (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with Human Immunodeficiency Virus: VZV disease of the central nervous system or subclinical reactivation of VZV infection? *Clin Infec Dis* 1997;25:634-39
24. Cinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, D'Arminio Monforte A, Wahren B, Lazzarin A, Linde A. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342:398-401
25. Cinque P, Cleator GM, Weber T, Monteyne P, Sindic C, Gerna G, van Loon AM, Klapper PE. Diagnosis and clinical management of neurological disorders caused by cytomegalovirus in AIDS patients. European Union Concerted Action on virus meningitis and encephalitis. *J Neurovirol* 1998;4(1):120-32
26. Cinque P, Giudici B, Bossolasco S. The application of the polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid in the clinical management of AIDS-related CNS disorders. *AIDS Patient Care STDS* 1998;12(4):287-94
27. Cinque P, Vago L, Brytting M, Castagna A, Accordini A, Sundqvist VA et al. Cytomegalovirus infection of the central nervous system disease in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166:1408-11
28. Cinque P, Vago L, Dabnl H, Brytting M, Terreni MR, Fornara C et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996;10:951-

29. D'Arminio Monforte A, Cinque P, Vago L, Rocca A, Castagan A, Gervasoni C. A comparison of brain biopsy and CSF-PCR in the diagnosis of CNS lesions in AIDS patients. *J Neurol* 1997;244:35-9
30. Davis LE. Nervous system complications of systemic viral infections. In: Aminoff MJ, editors. *Neurology and General Medicine*. 2th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.731-56
31. De la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches to CMV infections in adult patients. *J Clin Virol* 2002;25:S1-S12
32. De Luca A, Cingolani A, Linzalone A, Ammassari A, Murri R, Giancola L, Maiuro G, Antinori A. Improved detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1343-46
33. De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, Grisetti S, Paglia MG, Gentile M, Cingolani A, Murri R, Liuzzi G, Monforte D'Arminio A, Antinori A. The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2000;182:1077-83
34. Echevarria JM, Casas I, Tenorio A, de Ory F, Martinez-Martin P. Detection of varicella-zoster virus-specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with acute aseptic meningitis and no cutaneous lesions. *J Med Virol* 1994;43(4):331-5
35. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Craford JT. Polymerase Chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990;161(5):977-81
36. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990;322(3):178-83

37. Fong IW, Briton CB, Luinstra KE, Toma E, Mahony JB. Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1995;33:484-5
38. Forman MS, Valsamakis A. Specimen collection, transport and processing: Virology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003.p.1227-41
39. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29(3):475-86
40. Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNAS chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Bioquímica Polonica* 2001;48(3):615-22
41. Gershon AA, La Russa P, Steinberg P. Varicella-zoster virus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC:ASM Press;2003.p.1319-30
42. Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, berno A, Small PM, Drobniewski Fet al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 1998;8(5):435-48
43. Gozlan J, Amrani ME, Baudrimont M, Costagliola D, Salord JM, Duvivier C, Picard O, Meyohas MC, Jacomet C, Schneider-Faveau et al. A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. *AIDS* 1995;9(3):253-60
44. Gozlan J, Salord JM, Rouillet E, Baudrimont N, Caburet F, Picard O et al. Rapid detection of cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neurologic disorders. *J Infect Dis* 1992;166:1416-21
45. Guffond T, Dewilde A, Lobert PE, Caparros-Lefebvre D, Hober D, Wattré P. Significance and clinical relevance of the detection of herpes simplex virus DNA by

polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from patients with presumed encephalitis. Clin Infect Dis 1994;18(5):744-9

46. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington DC:ASM Press;2003.p.13044-18
47. Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL. Rapide diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. J Clin Microbiol 2003;41(6):2323-9
48. Jeffery KJ, Bangham CM. Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infection. Curr Opin Infect Dis 1996;9:132-7
49. Jerome KR, Ashley RL. Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC:ASM Press;2003.p.1291-303
50. Joosten AA, van der Valk PD, Geelen JA, Severin WP, Jansen Steur EN. Tuberculose meningitis: pitfalls in diagnosis. Acta Neurol Scand. 2000;102(6):388-94
51. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, Chavez V, Jimenez J A, Chang MC, Lopez MJ, Evans CA. Optimization and evaluation of a PCR assay for detection toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. J Clin Microbiol 2002;40(12):4499-503
52. Julander I, Martin C, Lappalainen M, Guy E, Isberg B, Evengard B. Polymerase chain reaction for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in cerebrospinal fluid in HIV-positive patients. Scand J Infect Dis 2001;33(7):538-41
53. Kaul KL. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: impact on patient care. Clin Chem 2001;47(8):1553-8
54. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. J Mol Biol 1971;56(2):341-61

55. Knox KK, Carrigan DR. Active human herpesvirus (HHV-6) infection of the central nervous system in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995;9(1):69-73
56. Knox KK, Harrington DP, Carrigan DR. Fulminant human herpesvirus six encephalitis in a human immunodeficiency virus-infected infant. *J Med Virol* 1995;45(3):288-92
57. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, Tomomori C, Yamanishi K. Association of human herpes virus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. *J Infect Dis* 1993;167(5):1197-200
58. Kouri V, Suarez C, Resik S, Garcia S. Herpesvirus detection in immunocompromised patients with meningoencephalitis by polymerase chain reaction technic. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(3):186-90
59. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 1995;171:857-63
60. Lee LM Henderson DK. Emerging viral infections. *Curr Opin Infect Dis* 2001;14(4):467-80
61. Levy RM, Bredesen DE, Rosenblum ML, Davis RL. Central nervous system disorders in AIDS. *Immunol Ser* 1989;44:371-401
62. Levy RM, Pons VG, Rosenblum ML. Central nervous system mass lesions in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Neurosurg* 1984;61(1):9-16
63. Lichtheim L. The proposal of Quincke to withdraw cerebrospinal fluid by lumbar puncture in cases of brain disease. *Dtsch Med Wochenschr* 1893:1234

64. Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, Tsao WL, Lee HS, Lee WH. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *J Neurol* 1995;242(3):147-52
65. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4121-5
66. Linde A. Epstein-Barr virus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology* vol2, 8th ed. Washington DC:ASM Press;2003.p.1331-40
67. Lipscomb H, Tatsumi E, Harada S, Yetz J, Davis J, Bechtold T, Volsky DJ, Kuszynski C, Purtilo DT, Sonnabend J, et al. Epstein-Barr virus and chronic lymphadenomegaly in male homosexuals with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *AIDS Res* 1983-84;1(1):59-82
68. Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology* 1994;44(6):1161-4
69. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ* 2000;163(3):301-9
70. Luft BJ, Remington JS. AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1988;157(1):1-6
71. Major EO, Gravell M, Hou J. Human Polyomaviruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC:ASM Press; 2003. p.1524-33
72. Mamidi A, DeSimoni JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol* 2002;8(3):158-67
73. Marshall BG, Shaw RJ. New technology in the diagnosis of tuberculosis. *Br J Hosp Med* 1996;55(8):491-4

74. Michael JS, Lalitha MK, Cherian T, Thomas K, Mathai D, Abraham OC, Brahmadathan KN. Evaluation of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Ind J Tub.* 2002;49:133-7
75. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, Colimon R. Amplification of six major human herpesviruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol.* 1999;37(4):950-3
76. Monforte AA, Cinque P, Vago L, Rocca A, Castagan A, Gervasoni C. A comparison of brain biopsy and CSF-PCR in the diagnosis of CNS lesions in AIDS patients. *J Neurol* 1997;244(1):35-9
77. Moskowitz LB, Hensley GT, Chan JG, Gregorios J, Conley FK. The neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108(11):867-72
78. Mullis KB. The unusual origin of polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262(4):56-61, 64-5
79. Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine NA, Takei Y, Alford CA Jr. Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infec Dis* 1982;145:829-36
80. Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological and sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. 1990 *Scand J Infect Dis Suppl* 1990;69:19-36
81. Narayanan S, Parandaman V, Narayanan PR, Venkatesan P, Girish C, Mahadevan S, Rajajee S. Evaluation of PCR using TCR(4) and IS6110 primers in detection of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):2006-8
82. Nowak DA, Boehmer R, Fuchstt H. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. *Eur J Neurol* 2003;10(3):271-280
83. Orenstein R. Presenting syndromes of human immunodeficiency virus. *Mayo Clin Proc.* 2002;77(10):1093-102

84. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Walker DL. Cultivation of papova-like virus from brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1971;1:1257-60
85. Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003;3(10):633-43
86. Pellett PE, Tipples G. Human herpesviruses 6, 7 and 8. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 2, 8th ed. Washington DC:ASM Press; 2003.p.1341-59
87. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Mycobacterium: General characteristics, isolation, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC:ASM Press; 2003.p.532-59
88. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;327(23):1643-8
89. Powell KF, Anderson NE, Frith RW, Croxson MC. Non-invasive diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990;335:357-8
90. Quereda C, Corral I, Laguna F, Valencia ME, Tenorio A, Echevarria JE et al. Diagnostic utility of multiplex herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):3061-7
91. Read S, Wareing S, Jeffery K, Bangham C. Further development of multiplex PCR assays for laboratory diagnosis of viral meningitis and encephalitis. *PHLS Microbiology Digest* 1997;14(4):202-5
92. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):691-6

93. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1352-5
94. Relman DA. New technologies human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J Infect Dis* 2002;186(Suppl 2):254-8
95. Roizman B, Tognon M. Restriction endonuclease patterns of herpes simplex virus DNA: applications to diagnosis and molecular epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol* 1983;104:275-86
96. Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. Rapid detection of herpes-simples-virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex virus encephalitis. *Lancet* 1990;335:440-1
97. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91
98. Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, Amheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4
99. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, Halligan G, Biberfeld P, Wong-Staal F, Kramarsky B, Gallo RC. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986;234:596-601
100. Schwendemann G. Neurologic complications of AIDS. *Z Hautkr* 1988;63(5):357-65
101. Shoji H, Honda Y, Murai I, Sato Y, Oizumi K, Hondo R. Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of patients with herpes zoster meningitis *J Neurol*.1992;239(2):69-70
102. Siliciano R. Latency and reservoirs for HIV-1. *AIDS* 1999;13(Suppl A):49-58

103. Simko JP, Caliendo AM, Hogle K, Versalovic J. Differences in laboratory findings for cerebrospinal fluid specimens obtained from patients with meningitis or encephalitis due to herpes simplex virus (HSV) documented by detection of HSV DNA. *Clin Infect Dis* 2002;35:414-9
104. Skiest JD. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2002;34:103-15
105. Soni H, Musser MJ. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chemis.* 2001;47:809-14
106. Studahl M, Hagberg L, Rekabdar E, Bergström T. Herpesvirus DNA detection in CFS: differences in clinical presentation between alpha-beta- and gamma-herpesviruses. *Scand J Infect Dis* 2000;32:237-48
107. Tenover FC, Unger ER. Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology-Principles and Applications*. 1st ed. Rochester MN:Mayo Foundation;1993.p.3-2
108. Tyler KL. The uninvited guest: JC virus infection of neurons in PML. *Neurology* 2003;61(6):734-5
109. Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1997;46(3):188-94
110. Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *PNAS* 2002;99(24):15687-92
111. Wanke CA, Falutz JM, Shevitz A, Phair JP, Kotler DP. Clinical evaluation and management of metabolic and morphology abnormalities associated with human immunodeficiency virus *Clin Infect Dis* 2002;34(2):248-59

112. Watterson SA, Drobniewski FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J Clin Pathol* 2000;53(10):727-32
113. Weber T, Frye S, Bodemer M, Otto M, Luke W. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 1996;2(3):175-90
114. Weber T, Turner RW, Frye S, Ruf B, Haas J, Schielke E, Pohle HD, Lücke W, Lürer W, Felgenhauer K, Hunsmann G et al. Specific diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1994;169(5):1138-41
115. Wei CY, Hwang JJ, Chu CH, Lee CP. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by nested PCR assay in cerebrospinal fluid samples from patients with suspected tuberculous meningitis. *Kaohsiung J Med Sci* 1999;15(8):475-83
116. Weiss LM, Udem AS, Salgo M, Tanowitz HB, Wittner M. Sensitive and specific detection of toxoplasma DNA in an experimental murine model: Use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991;163(1):180-6
117. Wilson M, Jones JL, McAuley JB. Toxoplasma. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington DC:ASM Press; 2003. p.1970-80
118. Wolf DG, Spector SA. Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166(6):1412-5

Molecular analysis of cerebrospinal fluid by the polymerase chain reaction in HIV-infected patients under suspect of lymphocytic meningitis and encephalitis

Marisa Chesky†, Vivian de Lima Spode†, Luiz Fernando Jobim‡

†Laboratório de Biologia Molecular - Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia

Clínica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Brazil

‡Departamento de Medicina Interna - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e

Serviço de Imunologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Author for correspondence:

Marisa Chesky

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS – Brazil,

CEP 90035-000

E-mail: mchesky@hcpa.ufrgs.br

,

Abstract – Objectives: Verify the prevalence of opportunistic pathogens that cause neurological diseases in human immunodeficiency virus infected patients, to evaluate its association with clinical, laboratory and brain computed tomography findings; and to assess the utility of the PCR panel employed. Methods: A cross-sectional study was performed on 203 cerebrospinal fluids from HIV-infected patients and suspicion of lymphocytic meningitis and encephalitis. CSF was analyzed by nested PCR to test cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus types 1 and 2, varicella zoster virus, human herpesvirus type 6, JC virus, *Toxoplasma gondii* and mycobacterium. Results: PCR amplified at least one pathogen in 77 (38,0%) samples. The most prevalent pathogen was Epstein-Barr virus with 40 (20,0%) cases. Positive PCR showed association with high proteinorrachia and leukorrachia ($p=0,001$), meningism ($P=0,017$) and abnormal computed tomography ($p=0,006$). Conclusion: This PCR panel showed to be effective in screening neurological disorders in HIV-infected ,patients.

KEY-WORDS: polymerase chain reaction, cerebrospinal fluid, opportunistic infections, HIV.

Introduction

The polymerase chain reaction (PCR) has had great impact on the diagnosis of lymphocytic meningitis and encephalitis over the last decade¹. It has been studied extensively in the diagnosis of central nervous system (CNS) infections for its ability to detect small concentrations of target DNA from a specific genomic sequence of interest in the cerebrospinal fluid (CSF) in a few hours.

PCR has been evaluated in order to detect DNA from several infectious agents in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) who present neurological manifestations^{2,3-13}. In these patients, the CNS can be infected by HIV or by opportunistic agents causing serious morbidities such as motor and behavioral disorders, meningitis and encephalitis. Conventional laboratory techniques are inadequate for diagnosing the majority of CNS diseases related to AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). PCR application has made early diagnosis possible, helping, in a less invasive manner, to distinguish lesions produced by HIV from those caused by opportunistic agents such as cytomegalovirus (CMV) and JC virus (JCV)^{7,11}.

Although the incidence of some CNS opportunistic diseases in HIV infected patients has decreased in developed countries following the use of highly effective anti-retroviral therapy, many of these manifestations still represent an important diagnostic and therapeutic challenge world wide.

PCR amplification of pathogens in the CSF has clarified the etiology of certain atypical clinical manifestations of CNS. Currently, we know that in addition to causing meningitis without genital lesions, herpes simplex virus type 2 (HSV-2) has also been found in CSF patients presenting benign recurrent aseptic meningitis, like Mollaret's syndrome^{14,15}. Detection of HSV DNA in the CSF by PCR, with equal or higher sensitivity than brain biopsy, has become the choice for diagnosing herpetic encephalitis^{9,16}.

Publications of PCR studies to detect CMV in the CSF have shown reliable results for *in vivo* diagnosis of CMV-related CNS lesions, with sensitivity and specificity around 82% and 100 % respectively^{3,5}.

AIDS patients in advanced stages of the disease are at high risk to develop primary CNS lymphoma (PCNSL) which has a strong association with Epstein-Barr virus (EBV)¹⁷. Data from prospective e retrospective studies showed that PCR for Epstein-Barr virus (EBV) DNA in CSF is a less invasive tumor marker than cerebral biopsy, with sensitivity of 80-100% and specificity of 98,5-100%^{3,5,10}.

Cinque et al. reported that in HIV-infected patients, CSF PCR detected CNS infections caused by varicella zoster virus (VZV), both with neurological manifestations associated with this virus and with sub-clinical reactivation of infection. In this study, more than two-thirds of patients had VZV DNA in the CSF with radiological and clinical findings that suggested infections caused by other pathogens. So, PCR results should be considered with clinical and laboratory findings⁴.

Human herpes-virus type 6 (HHV-6) and HIV-1 are viruses that infect and replicate in CD4+ T cells and some studies have examined these interactions. Studies were performed to investigate the possible role of HHV-6 in producing disease in HIV infected patients, alone or associated with CMV, as well as the hypothesis that HHV6 accelerates the progression to AIDS^{1,15}. PCR protocols employing HHV-6 primers as a multiplex component have been developed. This enables simultaneous analysis in the same tube of two to six herpes-virus agents, commonly involved in diseases with undefined symptoms in AIDS patients^{13,19,20}.

De Luca et al. developed a nested PCR protocol to improve the sensitivity of DNA detection of JC virus (JCV) for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in CSF samples from AIDS patients, finding sensitivity of 90% and specificity of 99%. Their results showed that JCV concentration in the CSF is

very low, not exceeding 50 genomes eq/ μ L of CSF. The authors stress the need for a second spinal tap after one week, when PCR is negative and PML is highly suspect¹¹.

Joseph et al. undertook a study in order to optimize a PCR protocol for diagnosing encephalitis caused by *Toxoplasma gondii* (TE), using the gold standard, which is the protozoan inoculation in mice. This assay was tested in AIDS patients with confirmed TE. The authors achieved a test for CSF with positive and negative predictive value of 100% and 97%, respectively²¹.

Some studies have been reported to evaluate the PCR performance in the detection of tuberculous meningitis, returning 70-91% sensitivity and 95-100% specificity^{22,23}. Therefore, considering the assay's low sensitivity rates, negative PCR results do not exclude the diagnosis of tuberculous meningitis.

Using a robust PCR protocol devised by Read et al. as a reference to screen for virus, bacteria and protozoa that could cause aseptic meningitis and encephalitis, a similar study was performed in Brazil¹. CSF samples from 383 patients suspected of having lymphocytic meningitis and encephalitis and attended in emergency rooms of 5 hospitals in Porto Alegre were tested by PCR for 17 pathogens. The PCR detected at least one microorganism in 46 CSF specimens (12%) and these results correlated well with clinical, laboratory and neuro-imaging findings. Of the 46 positive PCR samples, 27 (58.7%) were from HIV-1 positive patients. Among 125 HIV infected patients screened, PCR was positive in 21.6%: EBV, 9 cases (8,8%), CMV 7, (5,6%), HSV 3 (2.4%), mycobacterium 3 (2,4%), VZV 2 (1.6%), *T. gondii* 1 (0.8%) and JCV 2 (1.6%)²⁴. Based on these data, the authors have devised this protocol.

This study's intention was to know the prevalence of pathogens that cause aseptic meningitis and encephalitis in HIV infected patients, to assess the use of this PCR screening panel in this group of patients, well as to verify the correlation between a positive PCR and laboratory, radiological and clinical patient findings.

Patients and methods

A cross-sectional study was performed on 203 CSF samples from male and female adult HIV-infected patients and with clinical suspicion of lymphocytic meningitis and encephalitis. These patients were seen in the emergency room of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and underwent spinal tap for routine laboratory evaluation from October 1997 through November 2002. A sample of CSF, as requested by the assisting physician, was sent to the molecular biology laboratory with a form containing the patients' data and symptoms for PCR assay. The clinical symptoms and signs analyzed were fever, confusion, seizure, headache, meningism, skin lesions and focal neurological signs. Clinical examination, spinal tap, blood collection and the brain computed tomography (CCT) were performed within 24 hours of patients' admission. The results of laboratory tests and CCT were later searched for in the patients' files.

The hospital's Ethics Committee approved the present study. Informed consent was not required because the spinal tap is mandatory for all patients with clinical suspicion of lymphocytic meningitis and encephalitis and a PCR test panel is available if requested by the physician.

The protocol included the pathogens that are difficult to diagnose by conventional methods and which more frequently cause CNS disorders in immunocompromised patients: CMV, EBV, HSV, VZV, HHV-6, JCV, *Toxoplasma gondii* and mycobacterium^{9,21,27}.

DNA extraction samples were performed with Qiagen QIAamp kit for viral RNA (Qiagen, Valência, USA) that co-purifies RNA and DNA, according to the manufacturer's instructions. The nested PCR in-house method, described in detail in a previous publication by Chesky et al, was used to test the CSF samples. In summary, primary PCR amplifications were performed in a solution of 50 µL total volume containing 10 µL of extracted nucleic acid. Secondary amplification with nested primers was performed on 2 µL of the first post-PCR reaction in a total volume of 25 µL²⁴. All amplifications were done

using a Perkin Elmer Applied Biosystems 9600 machine. For some pathogens, nested PCR in multiplex form were used. EBV, CMV and HHV-6 were searched for in the same reaction tube as triplex PCR and HSV and VZV were tested by a duplex PCR^{20,25}. The others microorganisms were tested separately¹. For detecting the mycobacterium DNA, gene primers that codified the 65 kDa antigen of mycobacterium were used and primers of IS6110 repetitive region were employed to identify *M. tuberculosis* complex^{26,27}. All samples were double-checked and if the results were not in agreement, the test was repeated from the extraction step. Amplification products were detected by their molecular weight following electrophoresis of 10 µL of the second reaction solution through an ethidium bromide-stained 2% agarose gel by UV light trans-illumination. Carry over contamination by amplified product was avoided with strict physical separation of pre- and post-PCR areas and negative controls for reagents and samples were used in each assay batch. Dilutions of cultures of screened pathogens were used as positive controls. Testing a panel of 20 coded specimens sent by the Public Health Laboratory, Oxford, UK, an external quality control was assessed. For some of the PCR assays, an accurate measurement of the molecular sensitivity of detection was made by determining the end-point dilutions of well-characterized virus preparations for which a positive PCR result was obtained²⁴.

Initially, statistical analysis was performed with descriptive techniques using a 95% confidence interval. Continuous variables with normal and asymmetrical distribution were compared to PCR results through the Student's t test and Mann-Whitney U test, respectively. For testing categorical variables with PCR results, the Fisher exact test was employed.

Results

PCR amplified the DNA of at least one pathogen in 77 (38.0) of 203 CSF specimens: EBV, 40 cases (20,0%), CMV, 12 (5.9%), JCV, 9 (4.4%), *T. gondii*, 8 (3.9%),

mycobacterium, 8 (3.9%), HSV, 7 (3.4%) and HZV, 7 (3.4%). DNA HHV-6 was not detected in any sample (Figure 1). Dual amplification was found in 12 samples (5.9 %) and 3 viruses were detected in one CSF (0,5%), with a final amount of 91 pathogens detected. Associations of dual infection were: EBV and CMV (2), EBV and VZV (2), EBV and mycobacterium (1), EBV and *T. gondii* (1), CMV and mycobacterium (2), CMV and HSV (2), CMV and *T. gondii* (1) and HSV and VZV (1). One patient who presented skin lesions, fever, confusion, levels of CD4 of 8 cells/ μ L and hypodense lesions on CT was positive PCR for CMV, EBV and HSV.

Median values of protein and leukocytes in CSF were significantly higher among the group of patients with positive PCR ($p < 0,001$) (Table 1). However, 23 cases of positive PCR in CSF presented less than 5 cells/ μ L. Glicorrachia was similar in both groups ($p = 0,329$) and abnormal CCT was associated with a positive PCR ($p = 0.006$) (Tables 1 and 2).

Meningism was the only clinical manifestation that showed correlation with a positive PCR ($p = 0.017$). Fever ($p = 0.59$), confusion ($p = 0.225$), headache ($p = 0.296$), seizure ($p = 0.349$), skin lesions ($p = 0.859$) and focal neurological signs ($p = 0.328$) were symptoms that appeared equally in both groups of patients (Table 2).

All patients with a positive PCR for CMV showed abnormal CCT. Twenty eight out of 40 patients with a positive PCR for EBV had abnormal neuro-imaging findings. Only 2 of 8 PCR showing positive for *T. gondii* had normal CCT. Eighth of 9 patients with DNA JCV patients in CSF presented leukocytes values equal or below four cells/ μ L and neuro-imaging findings were PML suggestive (Table 3). Among 7 patients with HSV positive PCR, only 3 had skin lesions. Two of 8 patients with VZV positive PCR, presented zoster activity, and 3 had CCT showing brain lesions. Six out of 8 mycobacterium detected by PCR were *Mycobacterium tuberculosis* complex, 5 CSF had negative cultures, 2 had positive cultures and 1 culture was not performed. Neuro-imaging findings showed abnormalities in five of these patients. The PCR did not amplify mycobacterium in 2

patients who had positive culture for mycobacterium identified as non-tuberculous *Mycobacterium* (NTM).

Discussion

All patients included in this study presented some clinical, laboratory or radiological findings suggestive of lymphocytic meningitis or encephalitis, 37.9% of cases were detected by PCR. Probably some patients with advanced AIDS could have HIV-1 encephalitis according to their clinical and CT findings, but we did not evaluate their outcome.

A CSF PCR for HSV is already the test of choice for herpetical encephalitis diagnostic, with sensitivity and specificity of 100% and 99.5% respectively⁸. However, despite demonstrating high specificity, PCR does not have sensitivity of 100% for the majority of pathogens studied.

This study produced data similar in pathogen frequencies to those from Cinque's et al. study that evaluated patients with the same features, but without PCR screening for mycobacterium and *T. gondii*⁹. The authors found DNA of one or more viruses in CSF of 36% of patients: HSV-1, 2%, HSV-2, 1%, VZV, 3%, CMV, 16%, EBV, 12%, HHV-6, 2% and JCV, 9%. Their research detected almost 3 times more CMV, 2 times more JVC and 1.7 times minus EBV than the present study.

In 2000, Quereda et al. employed a multiplex PCR to study herpes-virus group in CSF from HIV-infected patients and neurological complications. Herpes-virus DNA was found in 34% of patients: CMV, 24%, EBV, 7%, HSV, 3%, VZV, 4% and HHV6, 1%. Their HSV and VZV findings were similar of this study, but for CMV and EBV frequencies. In this same Quereda's study, 2 herpes-virus DNA were detected in the same sample of thirteen patients (5.2%): CMV+HSV, CMV+EBV and CMV+VZV, EBV+VZV and EBV+HHV6 with a very similar value to our findings of dual amplification (5.4%), in addition to some identical viral associations¹³.

In 2002, Minjolle et al. used PCR to search herpes-virus group in 23 CSF samples from HIV positive patients with clinical signs of CNS infection. They found the following results: CMV, 13%, EBV, 10.6%, HSV-1/ 2, 1.3% and HHV6, 0%. The authors also detected 1 case of co-infection (HSV-1 and CMV) and 1 case of triple infection (CMV+HSV-2+VZV)¹⁹.

Still in 1997, Tang et al. analyzed the clinical significance of CNS co-infection by herpes-virus group in patients who were probably HIV-negative. This study detected 3 cases (10%) of mixed viral infections: 1 case of CMV+EBV, 1 case of HSV+EBV and another of HSV+HHV6. The first 2 patients with double infection associated with EBV died and the last one experienced slow regression of disease that caused neurological damage. These outcomes suggest that co-infection with the herpes-virus group in CNS infection can have a poor prognosis²⁹.

Our study did not detect any case of HHV6 in the 203 CSF specimens analyzed. As in other studies, this virus is rarely detected in the CSF of HIV infected patients. It suggests that this herpes-virus is not related to the presented CNS disease^{2,13}.

Two cases of NTM were detected by culture but not amplified by PCR. This can be explained by the lack of sensitivity of the 65 kD primers for amplification of some atypical mycobacterium. All CSF samples were initially tested for 65 kD primers and if any mycobacterium was amplified by PCR, IS6110 primers were used to screen for *M. tuberculosis* complex.

The IS6110 primers used for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex seemed to be more sensitive than the 65 kD primers in amplifying *Mycobacterium* genus.

PCR detected DNA of at least one pathogen in 77(38,0%) CSF specimens that had clinical, laboratory or radiological suspicion of CNS infection. In the majority of the cases, the detected DNA was suggestive of being the etiologic agent of the neurological disease.

The HHV-6 screening had no use in our patient group and probably can be excluded from the PCR battery for HIV-positive patients with suspected CNS infection.

Multiplex PCR for testing these patients has enabled a large number of pathogen to be screened in less time, decreasing costs without affecting the assay sensitivity.

This PCR panel has proved to be a powerful diagnostic tool to investigate opportunistic CNS infections in HIV infected patients. Still, it is advisable for PCR results to be evaluated within the patient's clinical context with laboratory and radiological findings, mostly because of the latent nature of infection caused by the investigated pathogens.

With strict contamination control, efficient methods of sample purification, optimized protocols and implantation of internal and external quality controls, the PCR could be a reliable test.

PCR has been used as a complementary diagnostic test for CNS infections in HIV infected patients at a reference hospital for AIDS treatment.

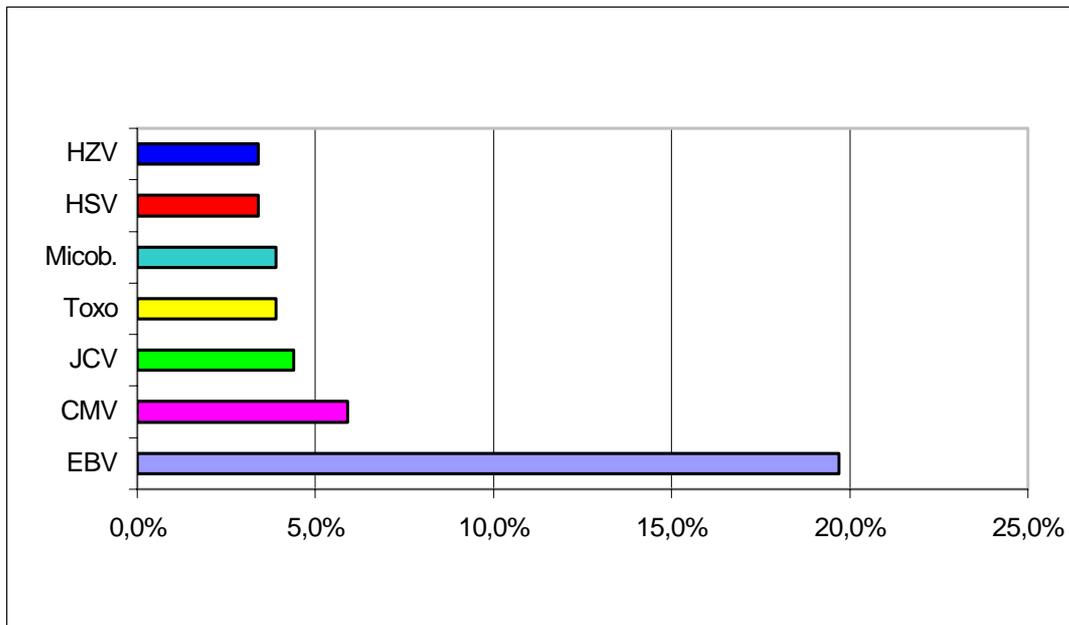


Figure 1 – Patogens prevalence in CSF amplified by PCR, VZV = varicella zoster HSV herpes simplex virus, Micob = mycobacterium, Toxo = *Toxoplasma gondii*, JCV = virus JC, CMV = cytomegalovirus and EBV = Epstein-Barr virus.

Table 1 - PCR results in CSF and correlation with laboratory findings

Variable	Positive PCR		Negative PCR		p value
	n	summary measure	n	summary measure	
Leukorrachia/ μ L	75	21 (3-70)	125	2 (1-10) *	< 0,001
Proteinorrachia(mg/dL)	74	124 (78-201)	122	58 (45-100)*	< 0,001
Glicorrachia(mg/dL)	73	55 SD \pm 25	121	58 SD \pm 24	0,329

CSF = cerebrospinal fluid

*Median (percentiles 25-75)

SD = standart deviation

Table 2 – PCR findings in CSF and correlation with clinical symptoms and CCT

Variable	Positive PCR		Negative PCR		p value
	n	mean%	n	mean%	
Meningism	31	40,3	26	20,6	0,017
Fever	43	55,8	52	41,3	0,059
FNS	17	22,1	36	28,6	0,328
Skin lesions	15	19,5	27	21,4	0,859
Confusion	36	46,8	48	38,1	0,242
Convulsions	11	14,3	25	19,8	0,349
Headache	25	32,5	51	40,5	0,296
CCT	54	78,3	61	57,0	0,006

FNS = focal neurologic signs

CCT = cerebral computed tomography

CSF = cerebrospinal fluid

Table 3 – Positive PCR results for JC virus in CSF and laboratory and clinical findings

Patient	Age	Fever	Mening	Headache	FNS	Leukocytes (cells/ μ L)	Protein (mg/dL)
1	37	N	N	N	Y	1	31
2	25	N	N	N	Y	3	80
3	39	Y	N	N	N	3	38
4	30	N	N	N	N	1	41
5	50	N	N	N	Y	1	29
6	40	Y	N	Y	N	4	33
7	44	Y	N	Y	N	2	34
8*	41	Y	Y	N	N	6	56
9	31	N	N	Y	Y	1	88

CSF = cerebrospinal fluid

FNS = focal neurological signs

Mening = meningism

Y = yes

N = no

NA = not available

*Patient with normal cerebral computed tomography

References

1. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):691-6
2. Bossolasco S, Marenzi R, Dahl H R F et al. Human herpes-virus 6 in cerebrospinal fluid of patients infected with HIV: frequency and clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1999;67:789-92
3. Cingolani A, De Luca A, Larocca LM et al. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(5):364-9
4. Cinque P, Bossolasco S, Vago L et al. Varicella-zoster (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with Human Immunodeficiency Virus: VZV disease of the central nervous system or sub-clinical reactivation of VZV infection? *Clin Infec Dis* 1997;25:634-39
5. Cinque P, Brytting M, Vago L et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342:398-401
6. Cinque P, Cleator GM, Weber T et al. Diagnosis and clinical management of neurological disorders caused by cytomegalovirus in AIDS patients. European Union Concerted Action on virus meningitis and encephalitis. *J Neurovirol* 1998;4(1):120-32
7. Cinque P, Giudici B, Bossolasco S. The application of the polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid in the clinical management of AIDS-related CNS disorders. *AIDS Patient Care STDS* 1998;12(4):287-94

8. Cinque P, Vago L, Brytting M et al. Cytomegalovirus infection of the central nervous system disease in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166:1408-11
9. Cinque P, Vago L, Dahl H et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996b;10:951-8
10. D'Arminio Monforte A, Cinque P, Vago L et al. A comparison of brain biopsy and CSF-PCR in the diagnosis of CNS lesions in AIDS patients. *J Neurol* 1997;244:35-9
11. De Luca A, Cingolani A, Linzalone A et al. Improved detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1343-6
12. Gozlan J, Amrani ME, Baudrimont M et al. A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. *AIDS* 1995;9(3):253-60
13. Quereda C, Corral I, Laguna F et al. Diagnostic utility of multiplex herpes-virus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):3061-7
14. Schlesinger Y, Tebas P, Gaudreault-Keener M, Buller RS, Storch GA. Herpes simplex virus type 2 meningitis in the absence of genital lesions: improved recognition with use of the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995;20:842-8

15. Tedder DG, Ashley R, Tyler KL, Levin MJ. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocytic meningitis. *Ann Intern Med* 1994;121(5):334-8
16. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 1995;171:857-63
17. MacMahon EM, Glass JD, Hayward SD et al. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991;338:969-73
18. Knox KK, Carrigan DR. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV-infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;11(4):370-8
19. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, Colimon R. Amplification of six major human herpes-viruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):950-3
20. Read S, Wareing S, Jeffery K, Bangham C. Further development of multiplex PCR assays for laboratory diagnosis of viral meningitis and encephalitis. *PHLS Microbiology Digest* 1997;14(4):202-5
21. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4499-503
22. Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, Tsao WL, Lee HS, Lee WH. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *J Neurol* 1995;242(3):147-52

23. Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology* 1994;44(6):1161-4
24. Chesky M, Scalco R, Failace L, Read S, Jobim LF. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq* 2000 Sep; 58(3B):836-42
25. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1352-5
26. Perosio PM, Frank TS. Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1993;100(6):643-7
27. Sechi LA, Pinna MP, Sanna A, Pirina P, Ginesu F, Saba F et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. *Mol Cell Probes* 1997;11(4):281-5
28. Cinque P, Vago L, Ceresa D et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 levels: correlation with HIV encephalitis. *AIDS* 1998;12:389-94
29. Tang YW, Espy MJ, Persing DH, Smith TF. Molecular evidence and clinical significance of herpes-virus co-infection in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2869-72

Análise molecular do líquido pela reação em cadeia da polimerase em pacientes com infecção pelo HIV-1 com suspeita de meningite e encefalite linfocitárias

Marisa Chesky¹, Vivian de Lima Spode², Luiz Fernando Jobim³

¹Farmacêutica-bioquímica do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Farmacêutica-bioquímica estagiária do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Professor do Departamento de Medicina Interna da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e chefe do Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Autor para correspondência:

Marisa Chesky

Hospital de clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia – Serviço de Patologia Clínica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS – Brasil.

CEP 90035-003

Email: mchesky@terra.com.br

Resumo - Objetivos: Verificar a prevalência dos microrganismos oportunistas que causam infecções neurológicas em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliar sua associação com os achados clínicos, laboratoriais e radiológicos; e verificar a utilidade do painel de PCR utilizado. Métodos: Foi realizado um estudo transversal, em 203 pacientes com infecção pelo HIV e suspeita de meningite/encefalite linfocitárias. A técnica de nested-PCR foi empregada para pesquisar citomegalovírus, Epstein-Barr vírus, herpes simplex vírus tipos 1/2, varicella zoster vírus, herpesvírus humano tipo 6, vírus JC, *Toxoplasma gondii* e micobactérias. Resultados: A PCR amplificou DNA de pelo menos um patógeno em 77 (38,0%) amostras. O microrganismo mais prevalente foi o Epstein-Barr vírus com 40 (20,0%) casos. PCR positivo mostrou associação com proteinorraquia e leucorraquia aumentadas ($p=0.001$), meningismo ($p=0.017$) e achados radiológicos alterados ($p=0.006$). Conclusão: Este painel de PCR se mostrou efetivo em triar infecções neurológicas nos pacientes em estudo.

PALAVRAS CHAVE: reação em cadeia da polimerase, líquido cefalorraquidiano, infecções oportunistas, HIV.

Introdução

A reação em cadeia da polimerase (PCR) teve grande impacto no diagnóstico das meningites e encefalites linfocitárias na última década¹. Esta técnica tem sido extensivamente aplicada no diagnóstico das infecções do sistema nervoso central (SNC) pelo seu potencial em detectar baixas concentrações de DNA do genoma de interesse, em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), em poucas horas.

A PCR tem sido muito estudada no diagnóstico das manifestações neurológicas em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) para detecção de fragmentos genômicos de muitos agentes infecciosos^{2,3-13}. Nestes pacientes, o SNC pode ser infectado pelo próprio HIV ou por agentes oportunistas, resultando em significativo comprometimento mental, motor e comportamental, meningites ou encefalites. Técnicas convencionais são pouco sensíveis para o diagnóstico da maioria das doenças infecciosas do SNC relacionadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). A aplicação da PCR tem possibilitado um diagnóstico precoce, auxiliando a diferenciar as lesões causadas pelo próprio HIV, daquelas provocadas por agentes oportunistas tais como o vírus JC (JCV) e o citomegalovírus (CMV), de uma maneira menos invasiva^{7,11}. Embora a incidência de algumas infecções oportunistas do SNC, nestes pacientes, tenha diminuído após o advento das terapias antivirais altamente ativas, muitas delas ainda representam um grande desafio diagnóstico e terapêutico em todo o mundo.

A amplificação do DNA de agentes infecciosos, no LCR por PCR, tem esclarecido a etiologia de algumas manifestações clínicas atípicas do SNC, anteriormente sem definição. Foi constatado que o herpes simples tipo 2 (HSV-2) além de causar meningite na ausência de lesões herpéticas genitais, também tem sido encontrado no LCR de pacientes com meningites linfocitárias recorrentes benignas, tais como a síndrome de Mollaret^{14,15}. A detecção do DNA do HSV no LCR pela PCR, com igual ou maior sensibilidade que a biópsia cerebral, tem se tornado o método de escolha para o diagnóstico da encefalite herpética^{9,16}.

Publicações de protocolos de PCR para a pesquisa CMV no LCR têm revelado resultados confiáveis para o diagnóstico *in vivo* de lesões do SNC relacionadas ao CMV, com uma sensibilidade e especificidade em torno de 82 e 100% respectivamente ^{3,5}.

Pacientes nos estágios avançados da SIDA apresentam alto risco de desenvolver linfoma primário do SNC (LPSNC) que possui forte associação com o vírus Epstein-Barr (EBV)¹⁷. Resultados de estudos retrospectivos e prospectivos têm mostrado que a PCR para EBV no LCR é um marcador tumoral menos invasivo que a biópsia cerebral, com sensibilidade entre 80% e 100% e especificidade entre 98,5 e 100% ^{3,5,10}.

Cinque et al. comprovaram que, em pacientes infectados pelo HIV, a PCR no LCR, pode detectar infecções pelo vírus da varicela zoster (HZV) no SNC tanto com manifestações neurológicas associadas ao vírus como na forma de reativação subclínica da infecção. Neste mesmo estudo, mais de dois terços dos pacientes que tinham DNA de HZV no LCR apresentavam achados radiológicos e clínicos sugestivos de infecções causadas por outros agentes. Portanto, os resultados da PCR devem ser avaliados dentro do contexto clínico e laboratorial do paciente⁴.

O vírus do herpes humano tipo 6 (HHV6) e o HIV-1 infectam e replicam nas células T CD4+ e muitos estudos tem examinado essas interações. Alguns pesquisadores estão estudando o possível papel do HHV6 em provocar doenças em pacientes HIV positivos, sozinho ou associado ao CMV, e também a hipótese de que o HHV6 acelera a progressão para SIDA^{1,15}. Protocolos de PCR utilizando *primers* de HHV6 como componente de um *multiplex* têm sido desenvolvidos. Esta estratégia possibilita a análise simultânea, em um único tubo, de dois a seis agentes herpesvírus, comumente envolvidos em doenças com sintomas indistinguíveis em pacientes com SIDA^{13,19,20}.

De Luca et al. desenvolveram um protocolo de *nested* PCR (PCR dupla) para melhorar a sensibilidade da técnica na detecção do vírus JC para o diagnóstico da leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) em pacientes com SIDA. Os autores obtiveram uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 99% e seus resultados

mostraram que a concentração do JCV no LCR é muita baixa, nunca excedendo 50 genomas eq/ μ L. Os autores salientam a necessidade de uma segunda punção de LCR com um intervalo de uma semana, quando a PCR for negativa e houver forte suspeita de LMP¹¹.

Joseph et al. desenvolveram um estudo para otimizar o ensaio da PCR no diagnóstico da encefalite por *Toxoplasma gondii* (ET), usando o padrão ouro que é a inoculação do protozoário em ratos. O valor diagnóstico da PCR foi avaliado em pacientes com SIDA com ET confirmadas. Os autores obtiveram um teste para o LCR com um valor preditivo positivo e negativo de 100% e 97%, respectivamente²¹.

Alguns artigos têm sido publicados avaliando a PCR no LCR para o diagnóstico da meningite tuberculosa reportando sensibilidade entre 70 e 91% e especificidade entre 95 e 100%^{22,23}. Portanto, um PCR negativo não exclui o diagnóstico de meningite tuberculosa.

Tendo como referência um protocolo abrangente de PCR desenvolvido por Read et al. para pesquisar vírus, bactérias e protozoários capazes de causar meningite e encefalite assépticas, estudo semelhante foi aplicado em Porto Alegre¹. Foram avaliadas 383 amostras de LCR de pacientes com suspeita de meningite ou encefalite assépticas oriundos da emergência de 5 hospitais de Porto Alegre, para pesquisar 17 tipos de microrganismos. A PCR detectou pelo menos um microrganismo em 46 amostras (12%) e houve correlação com os achados clínicos, líquóricos e de imagem na maioria dos casos. Das amostras positivas, 27 (58,7%) eram de pacientes que apresentavam infecção pelo HIV. Dos 125 pacientes com infecção pelo HIV, a PCR foi positiva em 21,6% das amostras: EBV 9 casos (7,2%), CMV 7 casos (5,6%), HSV 3 casos (2,4%), micobactérias 3 (2,4%), HZV 2 casos (1,6%), *T. gondii* 1 caso (0,8%) e JCV 2 casos (1,6%)²⁴. Baseando-se nestes dados, foi elaborado este estudo para testar o LCR dos pacientes com SIDA que apresentavam suspeita clínica de meningite ou encefalite linfocitárias.

Os objetivos deste estudo foram conhecer a prevalência dos microrganismos envolvidos nas infecções do SNC nestes pacientes, avaliar a utilidade do painel de PCR aplicado e verificar a existência de associação de um PCR positivo com os achados bioquímicos e celulares do LCR. Avaliou-se, também, a relação de um PCR positivo com os sinais e sintomas clínicos e com a tomografia computadorizada do cérebro nos pacientes em estudo.

Pacientes e métodos

Foi realizado um estudo transversal, em 203 amostras de LCR de pacientes adultos com infecção pelo HIV, de ambos os sexos, com suspeita clínica de meningite ou encefalite linfocitárias. Estes pacientes foram atendidos na emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e submetidos à punção lombar para avaliação laboratorial de rotina durante o período de outubro de 1997 a novembro de 2002. Uma alíquota do material, para a realização do PCR, conforme solicitado pelo médico assistente, foi encaminhada ao laboratório de biologia molecular acompanhada de um protocolo devidamente preenchido com os dados clínicos do paciente. Os sintomas e sinais avaliados foram: febre, convulsão, cefaléia, meningismo, sinais neurológicos focais (SNF) e lesões de pele. Os exames clínicos, a punção lombar, a coleta de sangue e a TCC foram realizados em um intervalo de 24 horas desde a admissão do paciente. Posteriormente, os resultados dos exames laboratoriais e da tomografia computadorizada do cérebro (TCC) eram pesquisados via sistema informatizado ou através dos prontuários.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Não foi usado consentimento informado, pois este painel de PCR já se encontrava a disposição do corpo clínico para que fosse solicitado para estes pacientes com suspeita de meningite ou encefalite assépticas.

Neste protocolo foram incluídos os microrganismos que apresentam dificuldade diagnóstica pelos métodos convencionais e que mais freqüentemente causam infecção

no SNC dos pacientes imunocomprometidos: CMV, EBV, HSV tipos 1 e 2, HZV, HHV-6, JCV, *Toxoplasma gondii* e micobactérias^{9,21,27}.

A purificação do material genético das amostras foi realizada empregando o kit Qiagen® QIAamp para RNA viral (Qiagen, Valencia, USA), que copurifica RNA e DNA, conforme instruções do fabricante. A PCR dupla ou nested PCR *in house* cujo método foi descrito em detalhes por Chesky et al. foi empregada para testar as amostras²⁴. Em resumo, a primeira amplificação de PCR foi realizada em um volume total de 50 µL contendo 10 µL do DNA extraído. A segunda reação de PCR com os *primers* internos foi executada com 2 µL do produto amplificado na primeira reação. As mesmas concentrações de reagentes foram empregadas, mas com volume final de 25 µL. O equipamento usado para as amplificações foi o termociclador Perkin Elmer, Applied Biosystem 9600. A PCR dupla, no formato *multiplex*, foi empregada para testar EBV, CMV e HHV-6 na mesma reação, assim como HSV e HZV^{20,25}. Os demais microrganismos foram testados individualmente²⁵. Para detectar o DNA micobacteriano foram utilizados *primers* do gene que codifica o antígeno 65 kD das micobactérias²⁶. *Primers* da seqüência repetitiva IS6110 foram empregados para identificar o complexo *Mycobacterium tuberculosis*²⁷. Todas as amostras foram testadas em duplicata e um resultado discordante foi repetido desde a extração. O produto amplificado foi detectado através de sua mobilidade eletroforética em transiluminador ultravioleta, empregando-se 10 µL da segunda reação de PCR em gel de agarose a 2% com brometo de etídio.

Precauções com contaminações de pré e pós-amplificação foram controladas com separação física das áreas de trabalho e com o uso de controles negativos e brancos de reagentes em todas as baterias. Como controle da qualidade interna foram empregadas diluições de culturas dos patógenos pesquisados em cada amplificação. Para validação da técnica, um painel cego de 20 amostras foi testado, com os diferentes patógenos, enviadas pelo Public Health Laboratory, Oxford, UK. Em alguns ensaios de PCR uma medida acurada de detecção de sensibilidade molecular foi realizada pela determinação

do ponto final de diluições de cultura virais cujas concentrações foram previamente estabelecidas por microscopia eletrônica²⁴.

A análise estatística dos resultados foi realizada, inicialmente, com técnicas descritivas, estimando-se um intervalo de confiança de 95%. As variáveis contínuas com distribuição normal e com distribuição assimétrica foram comparadas com os resultados da PCR através do teste *t* de Student e do teste de Mann-Whitney U, respectivamente. Para testar a relação das variáveis categóricas com a PCR, foi empregado o teste exato de Fisher.

Resultados

Das 203 amostras de líquido pesquisadas, a PCR amplificou o DNA de pelo menos um patógeno em 77 (38%) amostras: EBV 40 (20,0%) casos, CMV 12 (5,9%), JCV 9 (4,4%), *T.gondii* 8 (3,9%), micobactérias 8 (3,9%), HSV 7 (3,4%), HZV 7 (3,4%). O HHV6 não foi amplificado em nenhuma amostra de LCR (Figura 1). Em 12 (5,9%) amostras foram detectados 2 microrganismos e em uma amostra a PCR amplificou 3 patógenos, totalizando 91 agentes infecciosos identificados. As associações de detecção dupla foram: EBV+CMV (1), EBV+HZV (2), EBV+ micobactérias (1), EBV+*T.gondii* (1), CMV+micobactérias (2), CMV+HSV (2), CMV+*T.gondii* (1) e HSV+HZV (1). A PCR detectou CMV, EBV e HSV no LCR de um paciente que apresentava lesões de pele, confusão, febre, níveis de CD4 de 8 células/ μ L e TCC com lesões hipodensas.

Proteinorraquia e leucorraquia tiveram valores de medianas significativamente maiores no grupo de pacientes com PCR positiva em comparação ao grupo de pacientes com PCR negativa ($p < 0,001$) (Tabela 1). Entretanto, tivemos 23 casos de PCR positiva em amostras de LCR que apresentavam menos de 5 células/ μ L. O valor médio da glicorraquia nos dois grupos de pacientes foi semelhante ($p = 0,329$) e alterações da TCC foram encontradas em 54 (78%) pacientes com PCR positiva ($p = 0,006$) (tabelas 1 e 2).

Dos sinais e sintomas clínicos avaliados, apenas o meningismo apresentou associação com uma PCR positiva ($p=0,017$). Febre ($p=0,059$), confusão ($p=0,225$), cefaléia ($p=0,296$), convulsão ($p=0,349$), lesões de pele ($p=0,859$) e sinais neurológicos focais ($p=0,328$) foram manifestações que se apresentaram igualmente nos dois grupos (Tabela 2).

Todos os pacientes com PCR positiva para CMV apresentaram alterações na TCC. Dos 40 pacientes com PCR positiva para EBV, 28 tinham alterações de neuroimagem. Entre os 8 pacientes com PCR positiva para *T. gondii*, apenas 2 tinham achados radiológicos normais. Oito dos 9 pacientes com DNA do vírus JC no LCR apresentaram valores de leucócitos iguais ou menores que 4 células/ μL e achados tomográficos sugestivos de LMP (Tabela 3). Dos sete pacientes que apresentavam DNA do HSV no LCR, apenas 3 exibiram lesões de pele. Entre os 7 pacientes com PCR positiva para VZV, apenas 2 apresentavam zoster em atividade e somente 3 tinham TCC com lesões no cérebro. Das 8 micobactérias detectadas no LCR, 6 pertenciam ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, 5 destas amostras tiveram culturas negativas, 2 tiveram culturas positivas e em um LCR a cultura não foi realizada. Os achados de imagem do cérebro mostraram alterações em 5 pacientes. A PCR deixou de detectar micobactéria em 2 pacientes cujas amostras de LCR apresentaram cultura positiva para micobactérias não pertencentes ao complexo *M.tuberculosis* (NMT).

Discussão

Neste estudo, onde os pacientes apresentavam algum sintoma clínico, laboratorial ou radiológico compatíveis com meningite ou encefalite linfocitárias a PCR detectou 38% dos casos. É possível que alguns destes pacientes, pudessem apresentar encefalite por HIV, de acordo com seus achados clínicos e tomográficos, entretanto, devido às características do estudo, este desfecho não foi avaliado.

Com exceção da PCR para HSV no LCR, que já é o teste de escolha no diagnóstico da encefalite herpética, pela sua sensibilidade e especificidade de 100% e 99,5% respectivamente, a PCR para a maioria dos microrganismos pesquisados neste estudo, embora possua alta especificidade, não possui 100% de sensibilidade⁸

O presente estudo encontrou dados similares ao estudo de Cinque et al., de 1996, que pesquisou pacientes com as mesmas características, embora sua bateria de PCR não contemplasse as micobactérias e o *T. gondii*⁹. Os autores encontraram DNA de um ou mais patógenos, no LCR, em 36,0% dos pacientes do estudo: HSV-1 2%, HSV-2 1%, HZV 3%, CMV 16%. EBV 12%, HHV6 2% e vírus JC 9%, assim detectando quase 3 vezes mais CMV, o dobro de JCV e 1,7 vez menos EBV que o presente estudo.

Quereda et al. utilizaram um PCR *multiplex* para pesquisar o grupo dos herpesvírus no LCR de pacientes HIV positivos com complicações neurológicas. O DNA dos herpesvírus foi encontrado em 34% dos pacientes: CMV 25%, EBV 7%, HSV 3%, VZV 4% e HHV-6 1%. Os achados de HSV e VZV foram semelhantes, enquanto que os percentuais de CMV e EBV diferiram bastante, pois no presente estudo, o EBV foi o vírus mais freqüente com 19,7%, enquanto que apenas 5,9% do pacientes apresentaram PCR positiva para CMV. Ainda no estudo de Quereda et al. em treze pacientes, (5,2%) a PCR detectou o DNA de 2 herpesvírus na mesma amostra: CMV+HSV, CMV+EBV e CMV+VZV, EBV+VZV e EBV+HHV-6, com um percentual muito semelhante ao deste estudo (5,4%), além de incluírem algumas associações virais idênticas¹³.

Minjolle et al. empregaram a PCR para pesquisar o grupo dos herpesvírus no LCR de 23 pacientes com infecção pelo HIV, com sinais clínicos de infecção do SNC, encontrando os seguintes resultados: CMV (13%), EBV (10,6%), HSV-1/2 (1,3%), VZV (5,3%) e HHV-6 (0%). Os autores também detectaram um caso de coinfeção com HSV-1+CMV e um caso de infecção tripla com CMV+HSV-2+VZV¹⁹.

Tang et al. analisaram a significância clínica da coinfeção no grupo dos herpesvírus no SNC, cujos pacientes eram provavelmente HIV negativos. O estudo detectou 3 (10%) infecções virais mistas no SNC: um caso de CMV + EBV, um caso de

HSV + EBV e um caso de HSV + HHV-6. Os dois primeiros pacientes que tinham infecção dupla associada ao EBV foram a óbito e o último paciente teve uma remissão lenta, permanecendo com seqüelas psiquiátricas. Estes desfechos sugerem que a coinfeção com o grupo dos herpesvírus pode ter um mau prognóstico nas infecções do SNC²⁹.

O presente estudo não detectou nenhum caso HHV-6 no LCR dos 203 pacientes analisados. De acordo com investigações anteriores, este vírus é raramente detectado no SNC de pacientes com infecção pelo HIV, sugerindo que o HHV-6 não tenha relação com a doença que está presente no SNC^{2,13}.

Os dois casos de NMT detectados pela cultura, mas não pela PCR, podem ter como causa a falta de sensibilidade dos *primers* do gene 65 kD em amplificar algumas micobactérias atípicas, pois todas as micobactérias do complexo *M.tuberculosis* foram inicialmente testadas com os primers 65 kD e posteriormente identificadas por *primers* da região IS6110. Os *primers* IS6110 empregados para identificar o complexo *Mycobacterium tuberculosis* pareceram ser mais sensíveis que os *primers* 65 kD para amplificar *Mycobacterium* spp.

A PCR detectou o DNA de pelo menos um microrganismo, em 77 amostras de pacientes, que apresentavam suspeita clínica, laboratorial ou radiológica de infecção do SNC. Na maioria dos casos, o agente etiológico detectado foi associado com a afecção neurológica presente.

A pesquisa de HHV-6 não teve utilidade no grupo destes pacientes e, provavelmente, pode ser excluída da bateria de PCR para pacientes HIV positivos com suspeita de infecção do SNC.

O uso do PCR *multiplex* tem possibilitado a pesquisa de um maior número de patógenos em um tempo total de 6 horas de reação, diminuindo custos sem afetar a sensibilidade dos resultados.

Este painel de PCR tem se mostrado uma ferramenta diagnóstica eficiente para investigar infecções oportunistas no SNC de pacientes HIV positivos. No entanto, é

recomendado que um resultado de PCR seja, sempre, avaliado dentro do contexto clínico, laboratorial e radiológico do paciente, principalmente devido à natureza latente da infecção causada pela maioria dos microrganismos investigados.

Com um controle rígido da contaminação, com métodos eficientes de purificação da amostra, com protocolos otimizados e com a implantação de controles da qualidade internos e externos, a PCR tem se tornado um teste diagnóstico confiável. Assim, PCR tem sido usada para complementar o diagnóstico das infecções do SNC em pacientes com infecção pelo HIV em um hospital de referência para tratamento da SIDA em nosso estado.

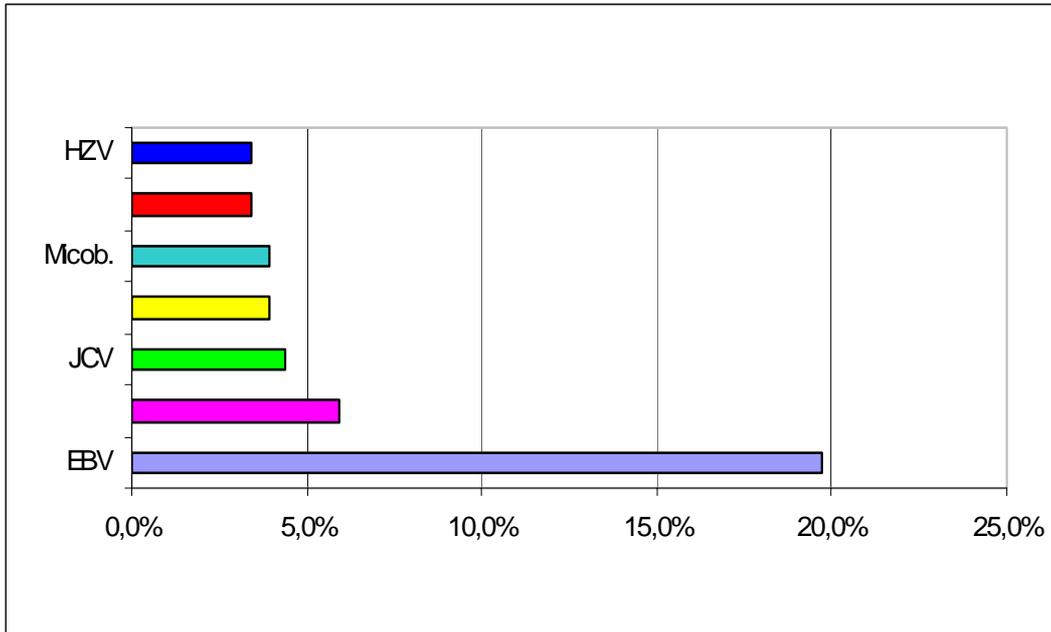


Figura 1 – Prevalência dos microrganismos amplificados no LCR por PCR
HZV = varicella zoster vírus, HSV = herpes simplex vírus, Mcob = micobactérias,
Toxo = *Toxoplasma gondii*, JCV = vírus JC, CMV = citomegalovírus e EBV =
Epstein-Barr vírus.

Tabela 1 - Resultados da PCR no LCR e correlação com achados laboratoriais

Variável	PCR positivo		PCR negativo		Valor de p
	n	medida resumo	n	medida resumo	
Leucócitos (LCR)	75	21 (3-70)	125	2* (1-10)	< 0,001
Proteínas (LCR)	74	124 (78-201)	122	58* (45-100)	< 0,001
Glicose (LCR)	73	55 DP \pm 25	121	58 DP \pm 24	0,329

LCR = líquido cefalorraquidiano

*Valores de medianas (percentis 25-75)

DP = desvio padrão

Tabela 2 - Relação da PCR no LCR com os sintomas/sinais clínicos e a TCC

Variável	PCR positivo		PCR negativo		Valor de p
	n	média %	n	média %	
Meningismo	31	40,3	26	20,6	0,017
Febre	43	55,8	52	41,3	0,059
SNF	17	22,1	36	28,6	0,328
Lesões de pele	15	19,5	27	21,4	0,328
Confusão	36	46,8	48	38,1	0,242
Convulsões	11	14,3	25	19,8	0,349
Cefaléia	25	32,5	51	40,5	0,296
TCC	54	78,3	61	57,0	0,006

LCR = líquido cefalorraquidiano

TCC = tomografia computadorizada do cérebro

SNF = sinais neurológicos focais

Tabela 3 – Resultados de PCR positivos para JCV no LCR e outros achados

Paciente	Idade	Febre	Mening	Cefaléia	SNF	Leucócitos LCR (cels/ μ L)	Proteína LCR (mg/dL)
1	37	N	N	N	S	1	31
2	25	N	N	N	S	3	80
3	39	S	N	N	N	3	38
4	30	N	N	N	N	1	41
5	50	N	N	N	S	1	29
6	40	S	N	S	N	4	33
7	44	S	N	S	N	2	34
8*	41	S	S	N	N	6	56
9	31	N	N	S	S	1	88

LCR = líquido cefalorraquidiano

SNF = sinais neurológicos focais

N = ausência S = presença NR = não realizado

*Paciente com tomografia computadorizada do cérebro normal

Bibliografia

1. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):691-6
2. Bossolasco S, Marenzi R, Dahl H R F et al. Human herpes-virus 6 in cerebrospinal fluid of patients infected with HIV: frequency and clinical significance. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1999;67:789-92
3. Cingolani A, De Luca A, Larocca LM et al. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(5):364-9
4. Cinque P, Bossolasco S, Vago L et al. Varicella-zoster (VZV) DNA in cerebrospinal fluid of patients infected with Human Immunodeficiency Virus: VZV disease of the central nervous system or sub-clinical reactivation of VZV infection? *Clin Infec Dis* 1997;25:634-39
5. Cinque P, Brytting M, Vago L et al. Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet* 1993;342:398-401
6. Cinque P, Cleator GM, Weber T et al. Diagnosis and clinical management of neurological disorders caused by cytomegalovirus in AIDS patients. European Union Concerted Action on virus meningitis and encephalitis. *J Neurovirol* 1998;4(1):120-32
7. Cinque P, Giudici B, Bossolasco S. The application of the polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid in the clinical management of AIDS-related CNS disorders. *AIDS Patient Care STDS* 1998;12(4):287-94
8. Cinque P, Vago L, Brytting M et al. Cytomegalovirus infection of the central nervous system disease in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1992;166:1408-11

9. Cinque P, Vago L, Dahl H et al. Polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid for diagnosis of virus-associated opportunistic diseases of the central nervous system in HIV-infected patients. *AIDS* 1996b;10:951-8
10. D'Arminio Monforte A, Cinque P, Vago L et al. A comparison of brain biopsy and CSF-PCR in the diagnosis of CNS lesions in AIDS patients. *J Neurol* 1997;244:35-9
11. De Luca A, Cingolani A, Linzalone A et al. Improved detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1343-6
12. Gozlan J, Amrani ME, Baudrimont M et al. A prospective evaluation of clinical criteria and polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid for the diagnosis of cytomegalovirus-related neurological diseases during AIDS. *AIDS* 1995;9(3):253-60
13. Quereda C, Corral I, Laguna F et al. Diagnostic utility of multiplex herpes-virus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):3061-7
14. Schlesinger Y, Tebas P, Gaudreault-Keener M, Buller RS, Storch GA. Herpes simplex virus type 2 meningitis in the absence of genital lesions: improved recognition with use of the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995;20:842-8
15. Tedder DG, Ashley R, Tyler KL, Levin MJ. Herpes simplex virus infection as a cause of benign recurrent lymphocytic meningitis. *Ann Intern Med* 1994;121(5):334-8
16. Lakeman FD, Whitley RJ, and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J Infect Dis* 1995;171:857-63
17. MacMahon EM, Glass JD, Hayward SD et al. Epstein-Barr virus in AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Lancet* 1991;338:969-73

18. Knox KK, Carrigan DR. Active HHV-6 infection in the lymph nodes of HIV-infected patients: in vitro evidence that HHV-6 can break HIV latency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;11(4):370-8
19. Minjolle S, Michelet C, Jusselin I, Joannes M, Cartier F, Colimon R. Amplification of six major human herpes-viruses from cerebrospinal fluid by a single PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):950-3
20. Read S, Wareing S, Jeffery K, Bangham C. Further development of multiplex PCR assays for laboratory diagnosis of viral meningitis and encephalitis. *PHLS Microbiology Digest* 1997;14(4):202-5
21. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH e al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4499-503
22. Lin JJ, Harn HJ, Hsu YD, Tsao WL, Lee HS, Lee WH. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *J Neurol* 1995;242(3):147-52
23. Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology* 1994;44(6):1161-4
24. Chesky M, Scalco R, Failace L, Read S, Jobim LF. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq* 2000 Sep;58(3B):836-42
25. Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1352-5
26. Perosio PM, Frank TS. Detection and species identification of mycobacteria in paraffin sections of lung biopsy specimens by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1993;100(6):643-7

27. Sechi LA, Pinna MP, Sanna A, Pirina P, Ginesu F, Saba F et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. *Mol Cell Probes* 1997;11(4):281-5
28. Cinque P, Vago L, Ceresa D et al. Cerebrospinal fluid HIV-1 levels: correlation with HIV encephalitis. *AIDS* 1998;12:389-94
29. Tang YW, Espy MJ, Persing DH, Smith TF. Molecular evidence and clinical significance of herpes-virus co-infection in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2869-72

ANEXO

Unidade de Imunologia - Serviço de Patologia Clínica - HCPA

Protocolo para análise do líquido por PCR em pacientes com infecção pelo HIV

Nome:	Reg:	Data:
-------	------	-------

Nº solicitação:	Idade:	Sexo:
-----------------	--------	-------

Suspeita Diagnóstica:

Sintomas:
<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Confusão <input type="checkbox"/> Cefaléia
<input type="checkbox"/> Meningismo <input type="checkbox"/> Sinais Neurológicos Focais <input type="checkbox"/> Outros
<input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> Lesões de Pele _____

Tratamento:

Líquor:		
Leucócitos:	Linfócitos:	Neutrófilos:

Eritrócitos:	Glicose:	Proteínas:
--------------	----------	------------

Gram:	Cultura:	Sorologia:
-------	----------	------------

Sangue:			
Leucócitos:	Bastões:	Segmentados:	Linfócitos:

CD4:	CD8:	Rel CD4/CD8:	Carga viral:
------	------	--------------	--------------

Glicose:	Sorologia:
----------	------------

<input type="checkbox"/> CMV	<input type="checkbox"/> HSV	<input type="checkbox"/> Micobactérias
<input type="checkbox"/> EBV	<input type="checkbox"/> VZV	<input type="checkbox"/> Toxo
<input type="checkbox"/> HHV6	<input type="checkbox"/> JCV	

Microrganismo Identificado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____

Observações
