



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências da Saúde

DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

CAROLINA DA CUNHA CORREIA

**VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DA CADEIA DE
POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE EM
PACIENTES COM AIDS**

RECIFE
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Centro de Ciências da Saúde

DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

CAROLINA DA CUNHA CORREIA

**VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DA CADEIA DE
POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE EM
PACIENTES COM AIDS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Pernambuco para obtenção
do Título de Doutor em Medicina Tropical

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo MD, PhD

Co-orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa MD, PhD

RECIFE 2009

Correia, Carolina da Cunha

Validação da reação da cadeia de polimerase em tempo real para o diagnóstico de neurotoxoplasmose em pacientes com AIDS / Carolina da Cunha Correia.– Recife : O Autor, 2009.

79 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Toxoplasmose cerebral na AIDS. 2. PCR – DNA *T. gondii*. I. Título.

616.993.1
616.936

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-059



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)¹

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

CAROLINA DA CUNHA CORREIA

No dia 12 de fevereiro de 2009, às 08h00, na Sala Prof. Murillo La Greca no 3º. and do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: **Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes (UFPE – Membro Interno)**, o **Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho (UPE – Membro Externo)**, a **Profa. Dra. Maria Isabel Lynch Gaete (UFPE – Membro Externo)**, a **Profª. Drª. Maria Tereza Cartaxo Muniz (UPE – Membro Externo)** e o **Prof. Dr. Oswaldo Massaiti Takayanagui (USP – Membro Externo)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **CAROLINA DA CUNHA CORREIA** sobre a sua Tese intitulada “**VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM AIDS**”. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Aprovado

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

Aprovado

Profª. Drª. Maria Isabel Lynch

Aprovada

Gaete Profª. Drª. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Aprovada

Prof. Dr. Oswaldo Massaiti Takayanagui

Aprovada

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Demócrito de Barros Miranda Filho
Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

Maria Isabel Lynch Gaete
Profª. Drª. Maria Isabel Lynch Gaete

Maria Tereza Cartaxo Muniz
Profª. Drª. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Oswaldo Massaiti Takayanagui
Prof. Dr. Oswaldo Massaiti Takayanagui

¹ Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>

À Lúcia Cunha, minha mãe,
Sem a qual nada, nunca, teria sido possível.
Agradeço pela vida, pelos estudos e por sua
existência.

AGRADECIMENTOS

À Brenda, minha filha, por trazer um sentido especial a minha vida.

A Rildo, meu marido, pelo apoio, estímulo e convívio suave nas etapas da vida.

Ao meu pai (*in memoriam*) que em poucas palavras, muito dizia.

Aos meus irmãos, Myrna e Adolpho, por valorizarem e se alegrarem com as etapas que cumpro na vida.

À Prof^a. Dr^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo, pela orientação deste estudo e preocupação em associar a medicina acadêmica aos resultados que possam beneficiar os pacientes.

Ao Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes, querido professor da nossa turma, pelas orientações simples, objetivas e paciência em nos fazer entender um pouco de estatística.

Aos colegas da turma do doutorado, Ana Cecília, Linda Delia, Matilde, Evanízio, Alba, Sônia, Liana e Tereza, pelo convívio harmonioso e possibilidade de crescimento conjunto.

À Dr^a. Solange Mesquita, pela colaboração na pesquisa e apoio, fundamentais na conclusão do estudo.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Tropical, Sr. Walter e Sr^a. Jupira, pela permanente disponibilidade em nos ajudar, dando-nos a sensação de estarmos em casa naquele departamento.

Aos pacientes, por nos ajudarem a compreender a inexatidão da medicina.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

Sempre acreditei que o portador de aids impunha na sociedade algo mais que medo de contágio. Ele desnuda várias facetas, às quais todo ser humano está exposto: vícios, dependências e amor. A possibilidade desse descontrole fragiliza o poderoso ser humano “perfeito”, “impune” e “imortal”.

RESUMO

CORREIA, Carolina da Cunha. Validação da reação da cadeia de polimerase em tempo real para o diagnóstico de neurotoxoplasmose em pacientes com aids. 2009. 83 f. Tese (Doutorado).- Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Medicina Tropical. Recife.

O diagnóstico da neurotoxoplasmose em portadores de aids pode ser difícil, requerendo distinção com outras neuroinfecções e lesões tumorais. Os exames complementares disponíveis trazem limitações para a confirmação da doença. A tese esteve composta por uma revisão da literatura, abordando o estado de arte dos métodos disponíveis para diagnóstico de neurotoxoplasmose, e por dois artigos: No primeiro, sob título *Lesão cerebral única de origem toxoplásmica*, foram analisados aspectos de ressonância magnética convencional de 10 pacientes com neurotoxoplasmose e lesão cerebral única, uma vez que essa forma de apresentação impõe maior dificuldade diagnóstica sendo pouco explorada na literatura. As imagens foram avaliadas quanto à localização das lesões, intensidade de sinal, tipo de realce após contraste, presença de alvo excêntrico e captação meníngea, em aparelho *Phillips* 1,5 Tesla, modelo *Achieva*[®]. As lesões não tiveram localização preferencial e ocorreram igualmente em regiões córtico-subcorticais e profundas. Na sequência T2, houve variabilidade de sinal, porém, no T1, predominaram padrões de iso ou hipossinal, edema perilesional e realce anelar após contraste, aspectos similares aos de lesões múltiplas, descritos na literatura. Concluiu-se que a presença desses padrões em lesões únicas pode ser sugestiva da neurotoxoplasmose. O segundo artigo, sob título *Influência de características da neurotoxoplasmose na sensibilidade da PCR em tempo real em pacientes com aids*, consistiu de estudo de validação fase III da reação em cadeia da polimerase em tempo real para detecção do gene B1 em sangue e líquido de pacientes com aids e diagnóstico presuntivo de neurotoxoplasmose. O DNA foi extraído com kit *QiAmp DNA*[®], marca *Qiagen*[®]; amplificado com uso de primers da marca *Applied Biosystem*[®], com sequência específica de 98 pares de bases do gene B1. As amostras foram processadas em termociclador *Icicle*[®], marca *Biorad*[®], operado pelo programa *PrimerExpress*. Foram incluídos 135 pacientes com sintomatologia neurológica encefálica, distribuídos em dois grupos: grupo I - 85 casos de neurotoxoplasmose e grupo II - 50 pacientes com manifestações neurológicas não toxoplásmicas. A PCR em tempo real em sangue revelou sensibilidade de 1,5% (IC 95% 0,1% - 9%), especificidade igual a 100% (IC 95% 87,7% - 100%), valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 5,5% - 100%) e valor preditivo negativo de 34,3% (IC 95% 25,4% - 44,4%). No líquido, houve sensibilidade igual a 35,8% (IC 95% 25,7% - 47,3%), especificidade igual a 100,0% (IC 95% 89,6% - 100,0%), valor preditivo positivo de 100,0% (IC 95% 85,4% - 100,0%) e valor preditivo negativo de 44,7% (IC 95% 34,5% - 55,3%). Nos pacientes do grupo I com pleocitorraquia e quatro ou mais lesões encefálicas pelo *T gondii*, a positividade líquórica da PCR foi significativamente maior do que a daqueles com normocitorraquia (p=0,021) e com até três lesões encefálicas (p=0,026). Concluiu-se que a PCR em tempo real no sangue não se mostrou útil ao diagnóstico; no LCR, o teste demonstrou baixa sensibilidade, mas alta especificidade para o diagnóstico da neurotoxoplasmose. Maior número de lesões e maior celularidade líquórica podem melhorar a sensibilidade do método. Sugerem-se novas pesquisas que correlacionem esses aspectos com os parâmetros de acurácia do método.

Palavras-chave: Toxoplasmose cerebral, AIDS, PCR, validação.

ABSTRACT

CORREIA, Carolina da Cunha. Validation of the real-time polymerase chain reaction for diagnosing neurotoxoplasmosis among aids patients. 83 p. Thesis. - Federal University of Pernambuco - Department of Tropical Medicine. Recife.

Cerebral toxoplasmosis among individuals with aids may be difficult to diagnose, and needs to be differentiated from other neurological infections and tumor lesions. Medical exams disposable are limited to diagnose the disease. This thesis was done considering a review from literature that focused in the state of art about the theme and two articles: In the first, *single cerebral lesion of toxoplasmotic origin*, MRI findings from 10 individuals with single cerebral lesions of toxoplasmotic origin were described, since this kind of the disease are more difficult to diagnose and seldom explored in literature. Images were analyzed considering location, signal intensity, pattern of contrast uptake, presence of central target and meningeal uptake. MRI was performed 1.5 Tesla device (Phillips; Achieva model). The lesions didn't show preferential location and occurred in cortico-subcortical and deep regions. . The T2 weighted sequences showed variable patterns of signal intensity. In the T1 sequence, the iso or hypointense signal predominated and was associated with circumjacent edema and ring contrast uptake, aspects similar to multiple cerebral lesions of toxoplasmic origin described in the literature. We concluded that the presence of these findings in single lesion, may be suggestive of neurotoxoplasmosis. In the second article entitled *Influence of neurotoxoplasmosis characteristics on real-time PCR sensibility among aids patients*, we performed a phase III validation study on the PCR for detecting the B1 gene of *Toxoplasma gondii* in blood and cerebrospinal fluid of aids patients with presumptive clinical diagnosis of cerebral toxoplasmosis. DNA was extracted using the QIAmp DNA kit (Qiagen®), and amplified using primers specific to sequence of 98 base pairs of the B1 gene (Applied Biosystem®). Samples were processed in a thermocycler (Biorad®; iCycle model), coupled to a workstation operating the PrimerExpress software. One hundred and thirty-five aids patients were studied, divided into two groups. Group I comprised 85 patients with neurotoxoplasmosis; Group II comprised 50 patients with neurological non-toxoplasmic diseases. Real-time PCR on blood revealed sensitivity of 1.5% (95% CI: 0.1% - 9.0%), specificity of 100.0% (95% CI: 87.7% - 100.0%), positive predictive value of 100.0% (95% CI: 5.5% - 100.0%) and negative predictive value of 34.3% (95% CI: 25.4% - 44.4%). Cerebrospinal fluid testing produced sensitivity of 35.8% (95% CI: 25.7% - 47.3%), specificity of 100.0% (95% CI: 89.6% - 100.0%), positive predictive value of 100.0% (95% CI: 85.4% - 100.0%) and negative predictive value of 44.7% (95% CI: 34.5% - 55.3%). Considering a group presenting pleocytosis and four or more encephalic lesions caused by *T. gondii*, the presence of these characteristics was associated with greater cerebrospinal fluid positivity seen on PCR compared to those with normal cellularity ($p=0,021$) and until three cerebral lesions ($p=0,026$). We concluded that real-time PCR on blood was not useful for diagnosis. Cerebrospinal fluid testing showed low sensitivity but high specificity for diagnosing cerebral toxoplasmosis. Greater numbers of lesions and greater cerebrospinal fluid cellularity may improve the sensitivity of the method. We suggest that new researches can correlate these aspects with the accuracy of the method.

Descriptors: Cerebral toxoplasmosis, aids, polymerase chain reaction, validation.

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 - Características de imagem das lesões únicas na toxoplasmose cerebral segundo localização 26

Tabela II.1– Características demográficas, clínica e laboratoriais segundo grupos de estudo..... 37

Tabela II.2– Distribuição da celularidade em líquido e do número de lesões encefálicas, segundo resultado da PCR em líquido..... 38

Table 1– Imaging characteristics of single lesions in cerebral toxoplasmosis cases, according to location 26

Table 1– Demographic, clinical and laboratory characteristics according to study group 37

Table 2– Distribution of cellularity of cerebrospinal fluid and number of encephalic lesions, according to the PCR result from cerebrospinal fluid 38

LISTA DE GRAVURAS

Figura I.1 – Lesão parietal, mantendo relação com o plano meníngeo.....	24
Figura I.2 – Lesão mesencefálica.....	24
Figura I.3 – Lesão ganglionar com aspecto heterogêneo no T2	25

Figure C.1– Parietal lesion, correlated with the meningeal plane	
Figure C. 2– Mesencephalic lesion	
Figure C.3– Ganglion lesion with heterogeneous appearance in T2	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	Síndrome de imunodeficiência adquirida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme immunesorbent assay
ETF	Encefalite toxoplásmica focal
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LCR	Líquido cefalorraquiano
NT	Neurotoxoplasmose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RM	Ressonância magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>T.gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TC	Tomografia computadorizada

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
3. PERGUNTA CONDUTORA	20
4. OBJETIVOS	21
<i>Geral</i>	<i>21</i>
<i>Específicos</i>	<i>21</i>
5. ARTIGO I - Lesão cerebral única de origem toxoplásmica	19
<i>Introdução</i>	<i>21</i>
<i>Pacientes e Métodos</i>	<i>22</i>
<i>Resultados</i>	<i>23</i>
<i>Discussão</i>	<i>26</i>
<i>Referências</i>	<i>28</i>
6. ARTIGO II - Influência de características da neurotoxoplasmose na sensibilidade da PCR em tempo real em pacientes com aids	30
<i>Introdução</i>	<i>33</i>
<i>Pacientes e Métodos</i>	<i>34</i>
<i>Resultados</i>	<i>37</i>
<i>Discussão</i>	<i>38</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>41</i>
7. CONCLUSÕES	44
8. RECOMENDAÇÃO	45
<i>Apêndice A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido</i>	<i>47</i>
<i>Apêndice B – Formulário de Pesquisa</i>	<i>48</i>
<i>Apêndice C – Versão do Artigo I, enviada para os Arquivos Brasileiros de Neuropsiquiatria</i>	<i>50</i>
<i>Introduction</i>	<i>52</i>
<i>Patients and Methods</i>	<i>53</i>
<i>Results</i>	<i>54</i>
<i>Discussion</i>	<i>57</i>
<i>References</i>	<i>59</i>
<i>Apêndice D – Versão do Artigo II, enviada para o Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene</i>	<i>61</i>
<i>Introduction</i>	<i>62</i>
<i>Patients and Methods</i>	<i>64</i>
<i>Results</i>	<i>66</i>
<i>Discussion</i>	<i>69</i>
<i>References</i>	<i>72</i>
<i>Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa</i>	<i>76</i>
<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>77</i>
<i>Apresentação</i>	<i>77</i>
<i>Referencial Teórico</i>	<i>78</i>

1. APRESENTAÇÃO

A neurotoxoplasmose (NT) é causada, habitualmente, pela reativação da forma cística latente do *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central. Nos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a doença é sinalizadora de grave imunodeficiência e, se não tratada, pode conduzir à morte¹.

O número de casos de NT declinou no Brasil e no mundo, após 1996, por ocasião da introdução da terapia antirretroviral altamente efetiva. No entanto ainda representa a infecção oportunista mais comum no sistema nervoso central neste país e a terceira doença definidora de síndrome de imunodeficiência adquirida (aids), em São Paulo².

Em países onde a soroprevalência para toxoplasmose é alta, a incidência da NT é estimada entre 30% a 40% nos pacientes com aids, que não fazem profilaxia³. Mesmo sendo manifestação neurológica freqüente, não são incomuns, na prática médica, apresentações pleomórficas da doença, exigindo diagnósticos diferenciais com outras neuroinfecções e doenças tumorais. A multiplicidade de complicações neurológicas nos portadores de aids, quer seja pela ação neurotrópica do vírus ou em decorrência de infecções oportunistas, tornou o diagnóstico e a condução clínica desses pacientes dependentes de exames complementares, embora não permitam firmar diagnóstico de certeza de NT. Estes exames incluem imagens e testes imunológicos em sangue e líquido cefalorraquiano.

O diagnóstico definitivo da encefalite toxoplásmica requer a demonstração de taquizoítos na biópsia cerebral. Pela impossibilidade de submeter os pacientes, rotineiramente a esse procedimento invasivo, admite-se a instituição empírica de terapia específica na presença de múltiplas lesões captantes de contraste radiológico, associadas ao resultado sorológico positivo para anticorpos antitoxoplasma. A resposta clínica a essa terapia tem sido o principal critério clínico diagnóstico⁴. Essa prática tem por objetivo minimizar os danos neurológicos que podem advir do retardo no diagnóstico da NT, o qual pode implicar em seqüelas neurológicas incapacitantes ou até mesmo na morte.

No entanto a prática dessa terapia empírica impõe alguns riscos, representados, sobretudo por algumas reações medicamentosas como farmacodermia e aplasia medular, além do retardo de outros diagnósticos que possam ter terapias específicas como tuberculose e criptococose ou, mais raramente, a possibilidade de resposta terapêutica por outros patógenos como *Babesia spp*⁵.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do *T. gondii* nos fluidos corporais tem sido utilizada com resultados promissores no diagnóstico das formas ocular e pulmonar⁶⁻⁷, além de permitir diagnóstico intrauterino da infecção evitando o uso de procedimentos mais invasivos sobre o feto⁸.

No caso da NT, os resultados do método *Nested PCR* são controversos. Alguns estudos têm atribuído tais divergências ao modo de extração do DNA, seleção dos *primers*, uso da enzima uracil-DNA-glicosilase com a finalidade de prevenir contaminação, tamanho molecular dos produtos do PCR e uso de controle interno^{7,9}. O emprego dos *primers* para detecção do gene B1 do *T gondii* tem demonstrado sensibilidade que varia de 13,3% a 65%¹⁰. Outras seqüências de amplificação de ácidos nucleicos, específicas para o parasito, também têm sido investigadas tais como: p30, TGR1¹¹, rDNA18S e rDNA5¹².

O isolamento sérico do DNA do toxoplasma pelo método *Nested PCR* tem apresentado sensibilidade menor que a líquórica e, por conseguinte, resultados que Franzen et al.¹³ afirmaram ter valor limitado.

A técnica de PCR em tempo real vem sendo utilizada, enfatizando-se as vantagens de prover resultados mais rápidos e mais sensíveis, além da possibilidade de quantificação dos genes, fornecendo parâmetros que avaliam indiretamente severidade da infecção e prognóstico da evolução clínica¹⁴.

Dada a necessidade de detecção da infecção pelo *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central em grupo de pacientes vulneráveis pela imunodeficiência, propõe-se estudo de validação fase III¹⁵ de detecção do DNA, por meio de reação em cadeia de polimerase em tempo real, para diagnóstico de neurotoxoplasmose em pacientes com aids.

Após uma revisão da literatura, na qual se apresenta o estado de arte sobre toxoplasmose cerebral e métodos complementares de diagnóstico, a tese está organizada em formato de artigos para publicação em periódicos.

No primeiro artigo, intitulado **“Lesão cerebral única de origem toxoplásmica”**, descrevem-se os aspectos das lesões encefálicas com o objetivo de alertar para esta forma de apresentação da doença.

O segundo artigo, sob tema **“Influência de características da neurotoxoplasmose na sensibilidade da PCR em tempo real em pacientes com aids”**, tem como objetivo avaliar a acurácia do método e descrever variáveis clínicas que possam interferir na sua sensibilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular, agente da infestação cosmopolita denominada toxoplasmose, largamente disseminada no mundo, presente na forma latente em cerca da metade da população¹. Tem, tradicionalmente, sido o agente etiológico mais comum das infecções oportunistas em pacientes com aids, caracterizando a encefalite toxoplásmica focal (ETF).

A soroprevalência da toxoplasmose nos pacientes com aids varia de acordo com o país de origem e o grupo socioeconômico a que pertencem. No Brasil, a prevalência é alta, atingindo 50% a 80% da população adulta²; em Recife, essa taxa é de 64% a 79%³. No México, tem sido referida como igual a 50%, na Espanha, 36,7%, na Tailândia, 53,7%¹. Nos Estados Unidos, a soroprevalência varia de 3% a 30%; ao passo que na França tem-se uma das taxas mais altas do mundo: 73% a 90% da população é infectada⁴.

Estima-se que cerca de 30% a 50% dos pacientes HIV positivos e infectados pelo *T. gondii* desenvolverão neurotoxoplasmose⁵⁻⁶. Nissapatorn et al.¹, estudando 505 pacientes com aids, atendidos entre 2001 e 2002 na Malásia, identificaram que 44,8% dos pacientes tinham soropositividade para *T. gondii*, dentre os quais apenas 47,4% desenvolveram encefalite toxoplásmica focal, principalmente aqueles com CD4 menor que 100 células/mm³ de sangue. Os autores¹ consideraram alta a taxa de mortalidade para os pacientes com ETF (31,6%) e caracterizaram a ocorrência desse evento na fase aguda da doença, em presença de alterações sistêmicas, num período variando entre dois e 528 dias após o início do tratamento.

A infestação se faz pela ingestão de alimentos contaminados por fezes de gato contendo oocistos, ou de carne suína ou caprina mal cozida. Segue-se a infestação sistêmica pelo *T. gondii*, que pode se alojar em múltiplos órgãos, incluindo baço, fígado, coração, pulmão, olho e cérebro. Desencadeia-se uma resposta imunológica capaz de eliminar o patógeno da maioria desses órgãos, mas não do cérebro⁷. Nele, o parasito persiste de tal forma que, nos pacientes com aids, a encefalite pelo *T. gondii* dá-se por reativação de infecção latente⁸, deflagrada pela ruptura dos cistos tissulares e seguida pela proliferação dos taquizoítos no tecido cerebral.

A NT também ocorre em pacientes soronegativos para HIV, porém imunocomprometidos por outras causas. Esse fato claramente indica a importância da resposta imune normal na resistência do cérebro ao *T. gondii*⁹.

As lesões cerebrais iniciam-se como encefalite focal e progridem para abscessos com necrose e inflamação circunjacente, onde os taquizoítos situam-se perifericamente e raramente são identificados no líquido cefalorraquiano¹⁰.

Estas podem ser únicas ou múltiplas, localizando-se, mais comumente, nos lobos parietal e frontal, na junção córtico-medular, na gânglia basal, no tálamo e na pituitária¹¹.

A suspeita clínica de neurotoxoplasmose baseia-se nos critérios descritos pelo *Centers for Disease Control*¹², os quais incluem: início recente de anormalidade neurológica focal consistente com doença intracraniana ou redução do nível de consciência, evidência de imagem cerebral com efeito de massa e captação de contraste vista por tomografia ou ressonância magnética, positividade de IgG sérica antitoxoplasma e resposta terapêutica adequada para toxoplasmose. Estes critérios, apesar de sugerirem, não são patognomônicos de NT. A encefalopatia toxoplásmica pode apresentar-se sob forma subaguda, com sintomatologia clínica polimórfica. Os sinais e sintomas são usualmente limitados ao sistema nervoso central (SNC), ocorrendo com frequências variáveis. Incluem: cefaléia (49% a 55% dos casos), febre (41% a 47% dos casos), alterações psicomotoras ou comportamentais (37% a 38%), confusão mental (15% a 52%), letargia (12% a 43%), hemiparesia (39% a 49%), convulsão (24% a 29%), ataxia (em torno de 30%) e paresia de nervos cranianos (17% a 28%)⁸. Outras manifestações clínicas menos comuns compreendem: mielite transversa, síndrome do cone medular e síndrome de secreção inapropriada do hormônio antidiurético¹³.

Apesar de a ETF ser a forma mais freqüente, em aproximadamente 10% dos pacientes pode se apresentar como encefalite difusa sem déficit focal detectável⁸.

Os exames complementares, embora não forneçam achados diagnósticos de certeza de NT, são importantes para fazer diagnóstico diferencial e auxiliar na condução clínica desses pacientes. Incluem exames de imagem e testes imunológicos em sangue e líquido cefalorraquiano⁸.

A tomografia computadorizada (TC) mostra múltiplas lesões anelares, captantes de contraste. A ressonância magnética (RM) permite visualizar lesões, que podem passar despercebidas à tomografia. Tais lesões são heterogêneas, com margens bem delimitadas, hiperintensas no T2 e captantes de contraste. Podem estar presentes ainda edema perilesional e hemorragia^{8,14-15}. Apesar destas alterações serem freqüentes na NT, são inespecíficas e podem estar presentes em outras doenças oportunistas que fazem parte do diagnóstico diferencial².

Alterações radiológicas menos freqüentes, quando presentes, podem dificultar uma condução terapêutica adequada; sendo descritas: lesões expansivas sem captação de contraste, presentes em até 20% dos casos; TC normal em paciente com ressonância

magnética alterada, achado relatado em 3,6% dos casos e TC com edema cerebral difuso e sem lesões focais, presente em 10% dos casos².

Os testes sorológicos específicos para a demonstração de anticorpos anti-*T. gondii* são habitualmente o passo inicial para o diagnóstico da doença. Diferentes testes sorológicos freqüentemente quantificam diferentes anticorpos, que possuem padrões únicos de aumento e redução após a infestação. O painel consiste em: teste de Sabin-Feldman, ELISA pela técnica do sanduíche para identificação de IgM, IgA e IgE e hemaglutinação por fixação de antígeno constituído por taquizoítos fixados com acetona. Além desses, podem ser utilizados ELISA ou imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos IgG⁷.

A pesquisa de imunoglobulinas IgA, IgM e IgE não tem mostrado utilidade no diagnóstico diferencial da encefalite toxoplásmica na aids¹⁶. Todavia, em praticamente todos os casos, algum desses testes para detecção de anticorpos IgG estabelece a presença ou ausência de exposição, embora 10% dos casos apresentarem sorologia negativa^{4,17-19}.

No paciente imunodeficiente, Joseph et al.⁵, em 2002, alertaram para o fato de haver limitações na pesquisa de imunoglobulinas antitoxoplasma. Borges e Figueiredo¹⁶ afirmam que a presença de IgG anti-*T. gondii* no soro não é um marcador diagnóstico de neurotoxoplasmose, porém sua ausência afasta o diagnóstico em 100% dos casos. Skiest⁸ relata que 97% dos pacientes com aids e toxoplasmose apresentam positividade para imunoglobulina G, mas para a imunoglobulina M esse percentual é muito menor.

Luft et al.¹⁹ alertam que, quando se suspeita de toxoplasmose em paciente imunodeficiente cronicamente infestado pelo parasito, ou seja, nos que têm documentada a positividade de anticorpos IgG específicos previamente ao início da imunodeficiência, outros testes sorológicos adicionais acrescentam muito pouco ou podem ser enganosos para a avaliação diagnóstica. Nesses pacientes, resultados que indicam aparente reativação (aumento dos títulos de IgG e IgM) podem estar presentes na ausência de infecção clínica aparente⁴.

Os testes líquóricos raramente são diagnósticos, pois os achados são inespecíficos e se associam ao fato de a NT causar lesões predominantemente parenquimatosas, com pouco ou nenhum envolvimento meníngeo²⁰. Freqüentemente os resultados desses testes são normais, mas podem ser evidenciadas anormalidades bioquímicas e celulares, incluindo hiperproteinorraquia, pleocitose linfocítica discreta e, ocasionalmente, hipoglicorraquia⁴.

Aproximadamente 50% dos pacientes com NT terá positividade de anticorpos específicos para *T. gondii* no líquido²¹. Este achado deve ser interpretado com cautela, pois

a quebra de barreira hemato-liquórica, por qualquer etiologia, poderá ser acompanhada de transferência passiva de anticorpos séricos para o líquido¹⁶.

Montoya⁴ afirma que um resultado sérico positivo não estabelece diagnóstico de neurotoxoplasmose, entretanto um teste negativo o exclui, ao passo que testes imunológicos no líquido são de pouca valia para o diagnóstico, haja visto ser a presença de anticorpos intratecais questionável²².

O manejo dos pacientes com aids e lesões cerebrais pode ser difícil devido a uma gama de possibilidades etiológicas. O diagnóstico laboratorial de rotina de doenças infecciosas tem mudado pouco nos últimos 50 anos²³ e esta limitação implica numa busca por métodos mais seguros para a condução dos pacientes com suspeita de neurotoxoplasmose.

As técnicas moleculares, tal como a reação em cadeia de polimerase (PCR), podem ajudar na melhor compreensão do estado de interação entre o parasito e o homem. A PCR para detecção do *Toxoplasma gondii* em pacientes com aids e doença neurológica, tem se mostrado útil em alguns estudos, porém nenhum foi suficientemente otimizado e validado com um número grande de indivíduos²⁴; sendo necessários mais estudos para explorar o valor clínico desta técnica no diagnóstico da forma cerebral da doença¹⁸.

3. PERGUNTA CONDUTORA

A reação em cadeia de polimerase em tempo real para detecção do DNA *Toxoplasma gondii* no LCR permite diferenciar neurotoxoplasmose de outras manifestações neurológicas em pacientes com aids, avaliados em três hospitais de referência na cidade do Recife, no período de Fevereiro de 2006 a Dezembro de 2008?

4. OBJETIVOS

Geral

Determinar a validade da PCR *Toxoplasma gondii* em relação ao critério de neurotoxoplasmose do CDC, nos pacientes atendidos em serviços de referência na cidade do Recife no período de Fevereiro de 2006 a Dezembro de 2008.

Específicos

- Estimar a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da PCR *Toxoplasma gondii* em relação ao diagnóstico padrão de neurotoxoplasmose preconizado pelo CDC;
- Caracterizar os achados dos exames complementares de imagem de ressonância magnética com contraste, do segmento cefálico dos pacientes com aids e diagnóstico presuntivo de neurotoxoplasmose;
- Comparar a positividade da PCR DNA-*Toxoplasma gondii* com o número de lesões cerebrais detectadas pelos exames de imagem por ressonância magnética com contraste dos pacientes com aids e diagnóstico presuntivo de neurotoxoplasmose;
- Descrever os achados líquóricos dos pacientes com aids e diagnóstico presuntivo de neurotoxoplasmose;
- Comparar a positividade da PCR DNA-*Toxoplasma gondii* com a celularidade líquórica dos pacientes com aids e diagnóstico presuntivo de neurotoxoplasmose

5. ARTIGO I - Lesão cerebral única de origem toxoplásmica

LESÃO CEREBRAL ÚNICA DE ORIGEM TOXOPLÁSMICA

Carolina da Cunha Correia¹ Heloísa Ramos Lacerda de Melo² Vláudia Maria Assis Costa³
Alessandra Mertens Queiroz Brainer⁴

Resumo

Objetivo: Descrever os achados de RM nos portadores de lesão cerebral única de origem toxoplásmica. **Pacientes e Métodos:** Em estudo prospectivo foram incluídos 61 pacientes portadores de neurotoxoplasmose (NT) e aids, dos quais 10(16,4%) eram portadores de lesão cerebral única. Imagens de RM foram obtidas em aparelho de 1,5T e o diagnóstico presuntivo da doença baseou-se nos critérios do CDC. As lesões foram analisadas quanto à sua localização, intensidade de sinal, tipo de realce após contraste, presença de alvo excêntrico e captação meníngea. **Resultados:** Esta série incluiu quatro homens e seis mulheres. A média de idade foi de $35,9 \pm 6,1$ anos. Houve cinco casos com lesões córtico-subcorticais e cinco com lesões profundas, entre as quais três (60%) possuíam localização infratentorial, sendo duas mesencefálicas e uma cerebelar. Na seqüência T1 predominaram os padrões de iso ou hipossinal independente da localização das lesões. Na seqüência T2 houve predomínio de hipersinal nas lesões profundas e variabilidade no sinal nas de topografia cortical. Edema perilesional e captação anelar pelo contraste ocorreram em 100% dos casos e a presença de alvo excêntrico e captação meníngea em menor freqüência. **Conclusão:** as lesões únicas na NT podem ocorrer igualmente em regiões córtico-subcorticais ou profundas. Os padrões de iso ou hipossinal no T1, edema perilesional e realce anelar após contraste são altamente sugestivos de NT, mesmo na presença de lesões únicas à RM.

Palavras-Chave: Toxoplasmose Cerebral. Aids. Ressonância Magnética.

¹ Médica Neurologista, Doutoranda da Universidade Federal de Pernambuco, MD

² Médica Infectologista do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, MD, PhD

³ Professora do Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco, MD, PhD

⁴ Médica Radiologista da Universidade de Pernambuco, MD

Autor Responsável

Carolina da Cunha Correia

Rua Hermógenes de Moraes, 230 apto 1003 – Madalena – Recife, Pernambuco, Brasil

Zip Code: 50610160

E-mail: carolina.dra@gmail.com

Abstract

Background: Cerebral lesions of toxoplasmic origin frequently are multiple but single lesions are not uncommon. **Purpose:** To describe the magnetic resonance findings in individuals with single cerebral lesions of toxoplasmodic origin. **Methods:** Sixty-one patients with cerebral toxoplasmosis and AIDS were included in a prospective study. Of these, 10 (16.4%) had a single cerebral lesion. Magnetic resonance images were obtained using a 1.5T device and the presumptive diagnosis of the disease was based on the criteria of the Centers for Disease Control. The lesions were analyzed regarding their location, signal intensity, type of enhancement after contrast, presence of eccentric target and meningeal uptake. **Results:** This series included four men and six women. The mean age was 35.9 ± 6.1 years. There were five cases with cortico-subcortical lesions and five cases with deep lesions, of which three (60%) had infratentorial locations; two of the latter were mesencephalic and the other cerebellar. In the T1 sequence, iso or hypointense signal patterns predominated, irrespective of the location of the lesion. In the T2 sequence, hyperintense signals predominated in deep lesions and signal variability in the cortical topography. Perilesional edema and ring contrast enhancement occurred in 100% of the cases, while eccentric targets and meningeal uptake were seen less frequently. **Conclusion:** Single cerebral toxoplasmosis lesions can occur both in cortico-subcortical and in deep regions. Iso or hypointense signal patterns in T1, perilesional edema and ring enhancement following contrast administration are highly suggestive of cerebral toxoplasmosis, even in the presence of single lesions on magnetic resonance.

Keywords: Cerebral toxoplasmosis, AIDS, Magnetic resonance image

Introdução

A neurotoxoplasmose (NT) é a infecção oportunista mais freqüente do sistema nervoso central (SNC) nos pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (aids). Estima-se que 30% a 50% dos pacientes HIV positivos e infectados pelo *T. gondii* desenvolverão NT¹⁻².

Entre as manifestações neurológicas da NT, a cefaléia e os déficits neurológicos focais são as mais freqüentes; entretanto, relatos de apresentações pleomórficas não são incomuns³.

Os métodos sorológicos atuais não são capazes de discriminar a fase latente da infecção daquela de reativação, assim o diagnóstico é baseado nos

aspectos clínicos e radiológicos, além da resposta terapêutica após tratamento específico⁴.

No estudo de imagem por ressonância magnética (RM), cerca de 70% das lesões da toxoplasmose cerebral são multifocais⁵ e localizadas na substância branca ou região de transição córtico-subcortical. Apresentam tipicamente foco de hipersinal em T2 e hipo-isossinal em T1, além de captação anelar pelo contraste e edema circunjacente nas seqüências T1⁶. Há, entretanto, ocasiões nas quais os aspectos das lesões cerebrais não são usuais tornando seu diagnóstico por imagem difícil⁷.

Dentre essas variações, estão as lesões únicas, as quais, embora sejam consideradas raras, podem estar presentes em 14% a 17% dos pacientes com aids⁸⁻⁹. Enquanto para as lesões múltiplas, já se tem um padrão de imagem sugestivo do diagnóstico, para as lesões únicas, ainda se investiga a existência de um padrão imagenológico que possa auxiliar na definição desses casos. Esta variabilidade dos padrões de imagem exige do neurologista cuidado na avaliação e não deve representar obstáculo à instituição imediata de terapia adequada.

O objetivo deste artigo é descrever os achados de RM de portadores de lesão cerebral única de origem toxoplásmica.

Pacientes e Métodos

No período de Janeiro de 2006 a Março de 2008, em estudo prospectivo, foram incluídos 61 pacientes com diagnóstico clínico de NT e aids, atendidos em dois serviços de referência em neurologia, situados na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, dos quais 10(16,4%) eram portadores de lesão cerebral única, identificada por ressonância magnética do segmento craniano.

A suspeita clínica de NT baseou-se nos critérios do CDC¹⁰, os quais incluem: início recente de anormalidade neurológica focal consistente com doença intracraniana ou redução do nível de consciência, evidência de imagem cerebral com efeito de massa e captação de contraste, vista por tomografia ou imagem por ressonância magnética, positividade de IgG sérica antitoxoplasma e resposta terapêutica adequada.

A ressonância magnética foi realizada em equipamento da marca Phillips 1.5 Tesla, modelo Achieva, em aparelho de alto campo magnético, com bobinas de gradientes de 33 miliTesla e polarização circular.

O protocolo utilizado incluiu as seqüências: a) sagital T1 “turbo spin-echo”, 6 mm de espessura (TR = 550, TE = 16) para melhor orientação das imagens subseqüentes; b) axial T2 “turbo spin-echo”, 5 mm de espessura (TR = 550, TE = 110, matrix = 256x224, FOV = 23 cm); c) *axial fluid attenuation inversion-recovery* (FLAIR), 5 mm de espessura (TR = 11.000, TE = 140, matrix = 272x224, FOV = 25 cm); d) axial T2 gradiente-echo (GRE), 5 mm de espessura (TR = 500, TE = 13, matrix = 256x192, FOV = 26 cm, *flip angle* = 20°); e) coronal T2 “turbo spin-echo”, 5 mm de espessura (TR = 550, TE = 110, matrix = 256x224, FOV = 23 cm). Foi utilizado contraste venoso gadopentato de dimeglumine (gadolíneo), nas seqüências ponderadas em axial e coronal T1 spin-echo, 5 mm de espessura (TR = 550, TE = 15, matrix = 256x224, FOV = 25).

As lesões foram analisadas quanto à sua localização, intensidade de sinal, tipo de realce após contraste, presença de alvo excêntrico e captação meníngea.

Os pacientes foram reavaliados em tempo médio de 90 dias e imagens de RM do segmento craniano foram repetidas para confirmar regressão das lesões.

Resultados

Esta série incluiu quatro homens e seis mulheres. A média de idade foi de $35,9 \pm 6,1$ anos.

Na análise das imagens obtidas por ressonância magnética convencional dos dez portadores de lesões cerebrais únicas de origem toxoplásmica, cinco localizaram-se na região córtico-subcortical nos lobos frontal, parietal e temporal, uma das quais mantinha relação com o plano meníngeo (Figura I.1).

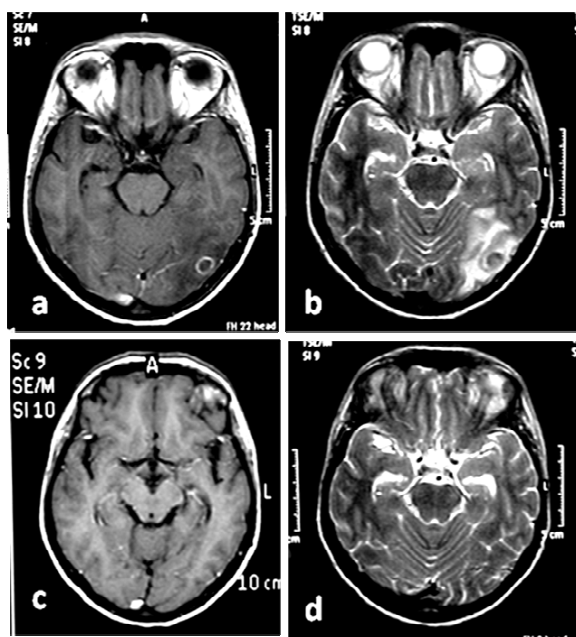


Figura I.1 – Lesão parietal, mantendo relação com o plano meníngeo

Legenda: a) e b) – seqüências pré-tratamento c) e d) Seqüências pós-tratamento – notar desaparecimento da lesão e do edema

Imagens: Fotos da Autora

Nas cinco lesões profundas, três (60%), tinham localização infratentorial, sendo duas mesencefálicas (Figura I.2) e uma cerebelar. Havia uma lesão talâmica e outra ganglionar (Figura I.3).

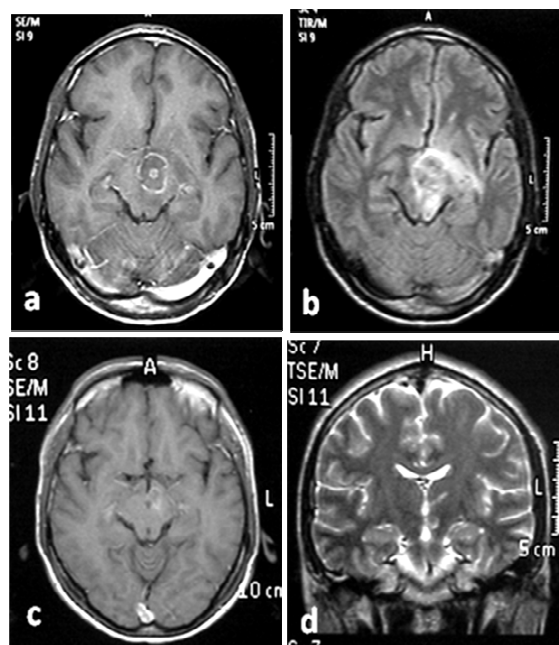


Figura I.2 – Lesão mesencefálica

Legenda: a) e b) – seqüências pré-tratamento c) e d) Seqüências pós-tratamento – notar redução da lesão e do edema cerebral

Imagens: Fotos da Autora

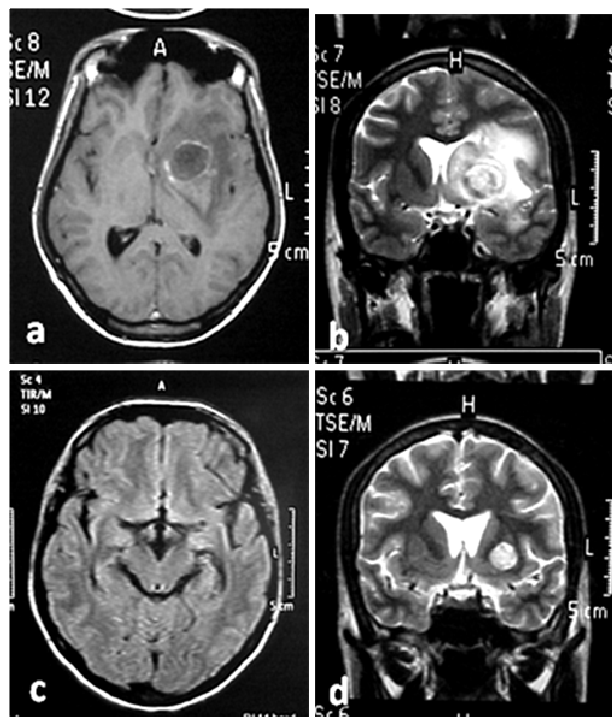


Figura I.3 – Lesão ganglionar com aspecto heterogêneo no T2

Legenda: a) e b) – seqüências pré-tratamento c) e d) Seqüências pós-tratamento – notar calcificação da lesão

Imagens: Fotos da Autora

Na seqüência T1, predominou o padrão de iso ou hipossinal. Nas seqüências ponderadas em T2, constataram-se: padrões variáveis na intensidade do sinal; hipersinal ou sinal heterogêneo nas lesões profundas, hipossinal em 50% dos casos nas lesões superficiais e edema perilesional em 100% dos casos.

Na seqüência *Flair*, estiveram presentes padrões heterogêneos, iso, hipo ou hipersinal.

Na seqüência T1 pós-contraste, houve realce das lesões em todos os casos, com predomínio de padrão anelar e apenas um dos casos revelou alvo central excêntrico (Tabela I.1).

Tabela I.1 - Características de imagem das lesões únicas na toxoplasmose cerebral segundo localização

<i>Características de imagem</i>	<i>Localização</i>	
	córtico-subcortical (n=5)	profunda (n=5)
T1		
Iso ou hipointenso	100,0	60,0
Heterogêneo	-	20,0
Hiperintenso	-	20,0
T2		
Hipointenso	20,0	20,0
Heterogêneo	40,0	20,0
Hiperintenso	40,0	60,0
Edema	100,0	100,0
Flair		
Hipointenso	20,0	
Isointenso	20,0	20,0
Heterogêneo	40,0	80,0
Hiperintenso	20,0	-
Realce anelar	100,0	100,0
Alvo central	-	20,0
Captação meníngea	40,0	-

Discussão

A NT apresenta sinais clínicos e líquóricos inespecíficos; o estudo do DNA do toxoplasma por reação em cadeia de polimerase ainda é alvo de investigação de sua aplicabilidade clínica. Estes aspectos tornam imperioso o reconhecimento dos padrões da NT na RM, realizada no início do quadro clínico.

O presente estudo mostra que a presença de lesão única na RM de portadores de NT não é incomum, pois ocorreu em 16,4% dos pacientes. Os padrões de iso ou hipossinal na seqüência T1, edema perilesional e realce anelar após administração de contraste, foram semelhantes aos encontrados em outros estudos^{6, 11}.

O valor preditivo positivo para toxoplasmose alcança 100%, quando as lesões cerebrais múltiplas associam-se com efeito de massa ou captação de contraste, sobretudo se pelo menos uma delas localiza-se na gânglia basal ou no tálamo⁷.

A presença de lesões cerebrais únicas de origem toxoplásmica é pouco descrita na literatura⁸⁻⁹, tornando a comparação dos achados deste estudo difícil, mesmo assim, foram considerados alguns aspectos.

Diferente de outros estudos que analisam o comportamento das lesões na NT, independente de sua localização, buscou-se identificar o aspecto destas discriminando sua localização.

Nossos achados de predomínio de iso ou hipossinal, na sequência T1, se repetiu tanto nas lesões córtico-subcorticais quanto nas profundas. Variações do sinal das lesões nesta sequência foram descritas, impossibilitando firmar diagnóstico baseado exclusivamente neste dado¹².

Nos estudos onde a sequência T2 foi analisada, predominaram os padrões de hiper ou isosinal¹³⁻¹⁵. O mesmo padrão descrito por esses autores esteve presente em nossos pacientes, contudo com uma diferença. O predomínio de padrão hiperintenso ocorreu nas lesões profundas e a presença de hipossinal independeu da localização das lesões.

Mesmo considerando o predomínio da intensidade das lesões em T2 segundo localização, chama atenção a diversidade destas lesões, impossibilitando o estabelecimento de um padrão que possa auxiliar no diagnóstico, nessa sequência.

A variabilidade de padrões na sequência T2 poderia decorrer dos aspectos evolutivos da lesão toxoplásmica. Em estudo comparativo dos padrões de RM com os achados neuropatológicos, a presença de iso ou hipossinal foi correlacionada com a fase de abscesso em formação; ao passo que a necrose liquefativa correspondeu ao hipsinal T2¹⁶.

As lesões multifocais pela NT nos pacientes com aids não determinam dificuldades diagnósticas, porém, na presença de lesão cerebral única, faz-se necessário diagnóstico diferencial, principalmente com linfoma primário do sistema nervoso central.

Alguns aspectos observados na nossa série alertaram para a possibilidade de origem toxoplásmica das lesões, conforme descrito por Berger¹⁷ ao descrever aspectos de imagem que poderiam auxiliar no dilema diagnóstico entre neurotoxoplasmose e linfoma primário do SNC: presença de edema marcante, presente em 100% de nossos casos; localização em transição córtico-subcortical, presente nesta casuística em 50% dos pacientes.

A análise dos achados das sequências de RM convencionais não consegue distinguir toxoplasmose cerebral de linfoma primário do SNC. Os

esforços na utilização de métodos adicionais como espectroscopia, difusão ou perfusão ainda não trouxeram respostas definitivas¹⁸.

Houve três casos de lesões com aspecto inflamatório em localização infratentorial; levando-nos a aventar a possibilidade de granuloma toxoplasmótico, uma vez que os linfomas primários do sistema nervoso central no imunodeprimido geralmente têm localização supratentorial e em gânglia basal¹⁹⁻²⁰. Ainda que se considere que a intensidade das lesões na NT não permite, por si só, um diagnóstico definitivo, valorizar a localização infratentorial da lesão única trouxe um dado a mais para diferenciar lesões toxoplásmicas de linfoma primário cerebral. Como esse diagnóstico diferencial ainda é um dilema¹⁷, qualquer informação adicional poderá ser valiosa.

Em resumo, as lesões únicas na toxoplasmose cerebral podem ocorrer igualmente em regiões córtico-subcorticais ou profundas. Nas lesões profundas a localização infratentorial pode ajudar na diferenciação com linfoma, uma vez que este é mais comum nas regiões supratentoriais. Os padrões de iso ou hipossinal no T1, edema perilesional e realce anelar após contraste são similares aos descritos nas lesões cerebrais múltiplas, sendo altamente sugestivos de NT, mesmo na presença de lesões únicas à RM.

Referências

1. 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;40:4499-503.
2. DUPON M, CAZENAVE J, PELLEGRIN JL, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2421-6.
3. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ E, ZAMORA F, BARNÉS J, et al. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral en pacientes cubanos con Sida. *Rev Neurol* 2002;34:618-21.
4. MEIRA CS, COSTA-SILVA TA, VIDAL JE, et al. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted–secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 2008;57:845–50.
5. CHANG L, CORNFORD ME, CHIANG FL, et al. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. *AJNR* 1995;15:1653-63.

6. MAEDA T, FUJII T, MATSUMURA T, et al. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: a case report. *J Infect* 2006;53:e167-e170.
7. KHAN AN. Toxoplasmosis, CNS. eMedicine. Available at www.emedicine.com/radio/topic703.htm. Accessed on 10/06/2008.
8. CIRILLO SF, ROSENBLUM ML. Imaging of solitary lesions in AIDS. *J Neurosurg* 1991;74:1029.
9. PORTER SB, SANDE MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;327:1643-8.
10. Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992;41(RR-17):1-19.
11. SUPIOT F, GUILLAUME MP, HERMANUS N, et al. Toxoplasma encephalitis in a HIV patient: unusual involvement of the corpus callosum. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99:287-90.
12. BRIGHTBILL TC, DONOVAN PMJ, HENSLEY GT, et al. MR of toxoplasma encephalitis: signal characteristics on T2 weighted images and pathologic correlation. *J Comp Assist Tomog* 1996;20:417-22.
13. KUPFER MC, ZEE CS, COLLETTI PM, et al. MRI evaluation of AIDS-related encephalopathy: toxoplasmosis vs lymphoma. *Magn Reson Imaging* 1990;8:51-7.
14. POST MJ, SHELDON JJ, HENSLEY GT, et al. Central nervous system disease in acquired immunodeficiency syndrome: prospective correlation using CT, MR imaging, and pathologic studies. *Radiology* 1986;158:141-14.
15. BATRA A, TRIPATHI P, GORTHI SP. Magnetic resonance evolution of cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency. *Acta Radiol* 2004;45:212-21.
16. NAVIA BA, PETITO CK, GOLD JWM, et al. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Ann Neurol* 1986;19:224-38.
17. BERGER JR. Mass lesions of the brain in AIDS: the dilemmas of distinguishing toxoplasmosis from primary CNS lymphomas. *Am J Neuroradiol* 2003;24:554-5.
18. SCHOEDER PC, POST MJD, OSCHATZ E, et al. Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishing central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. *Neuroradiol* 2006;48:715-20.
19. OSBORN AG. Diagnostic neuroradiology. St. Louis: Mosby 1994:620-2.
20. HALDORSEN SI, KRÅKENES J, GOPLEN KA, et al. AIDS-related primary central nervous system lymphoma: a Norwegian national survey 1989–2003. *BMC Cancer* 2008;8:225.

6. ARTIGO II - *Influência de características da neurotoxoplasmose na sensibilidade da PCR em tempo real em pacientes com aids*

Influência de características da neurotoxoplasmose na sensibilidade da PCR em tempo real em pacientes com aids

Carolina da Cunha Correia^{1,2}

Heloísa Ramos Lacerda de Melo^{1,3}

Vláudia Maria de Assis Costa¹

Autor Responsável

Carolina da Cunha Correia

Rua Hermógenes de Moraes, 230 apto 1003 – Madalena – Recife, Pernambuco,
Brasil

Zip Code: 50610160

E-mail: carolina.dra@gmail.com

¹ Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

² Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Brazil

³ Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Resumo

O diagnóstico da toxoplasmose cerebral em portadores de aids pode ser difícil, requerendo distinção com outras neuroinfecções e lesões tumorais. Realizamos estudo de validação da reação em cadeia de polimerase em tempo real para detecção do gene B1 no sangue e líquido de portadores de aids e diagnóstico de toxoplasmose cerebral. Foram estudados 135 portadores de aids e sintomatologia neurológica encefálica. No grupo I, foram incluídos 85 pacientes com neurotoxoplasmose. No grupo II, foram estudados 50 pacientes com manifestações neurológicas não toxoplásmicas. A PCR em tempo real em sangue revelou sensibilidade de 1,5% (IC 95% 0,1% - 9%), especificidade igual a 100% (IC 95% 87,7% - 100%), valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 5,5% - 100%) e valor preditivo negativo de 34,3% (IC 95% 25,4% - 44,4%). No LCR os resultados foram melhores, havendo sensibilidade igual a 35,8% (IC 95% 25,7% - 47,3%), especificidade igual a 100,0% (IC 95% 89,6% - 100,0%), valor preditivo positivo de 100,0% (IC 95% 85,4% - 100,0%) e valor preditivo negativo de 44,7% (IC 95% 34,5% - 55,3%). Ao analisarmos os resultados considerando-se presença de pleocitose e mais de quatro lesões encefálicas pelo *T gondii*, observamos que no grupo onde estas características estiveram presentes, houve maior positividade líquórica da PCR e esta diferença foi estatisticamente significativa. Concluimos que a PCR em tempo real no sangue não se mostrou útil ao diagnóstico. No LCR, o teste demonstrou baixa sensibilidade, mas elevada especificidade para o diagnóstico da toxoplasmose cerebral. Maior número de lesões e maior celularidade líquórica podem melhorar a sensibilidade do método.

Descritores: Toxoplasmose cerebral. Diagnóstico. Reação da cadeia de polimerase.

Abstract

Cerebral toxoplasmosis among individuals with AIDS may be difficult to diagnose, and needs to be differentiated from other neurological diseases. We performed a validation study on the real-time polymerase chain reaction (PCR) for detecting the B1 gene of *Toxoplasma gondii* in the blood and cerebrospinal fluid of AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. Were studied 135 AIDS patients, divided into two groups. Group I comprised 85 patients with neurotoxoplasmosis; Group II comprised 50 patients with neurological non-toxoplasmic diseases. Real-time PCR on blood revealed sensitivity of 1.5%, specificity of 100.0%, positive predictive value of 100.0% and negative predictive value of 34.3%. Cerebrospinal fluid testing produced better results: sensitivity of 35.8%, specificity of 100.0%, positive predictive value of 100.0% and negative predictive value of 44.7%. The group presenting with pleocytosis and four or more encephalic lesions was associated with greater cerebrospinal fluid positivity on PCR. We concluded that real-time PCR on blood was not useful for diagnosis. Cerebrospinal fluid testing showed low sensitivity but high specificity. Greater numbers of lesions and greater cerebrospinal fluid cellularity may improve the sensitivity of the method.

Descriptors: Cerebral toxoplasmosis. Diagnosis. Polymerase chain reaction.

Introdução

A neurotoxoplasmose (NT) é causada, habitualmente, pela reativação da forma cística latente do *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central (SNC)¹. Nos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a doença é sinalizadora de grave depleção imunológica e, se não tratada, pode conduzir invariavelmente à morte²⁻⁴.

Mesmo sendo doença neurológica freqüente, apresentações atípicas podem ocorrer, exigindo diagnósticos diferenciais com outras neuroinfecções e patologias tumorais, especialmente na síndrome de imunodeficiência adquirida (aids), na qual as complicações neurológicas são ainda mais variadas, quer seja pela ação neurotrópica do vírus ou em decorrência de infecções oportunistas⁵. Desta feita, o manejo clínico da neurotoxoplasmose tornou-se dependente de métodos complementares, dentre os quais: imagem⁶, testes imunológicos em sangue e líquido cefalorraquiano (LCR)⁷⁻⁸, além de biópsia cerebral, a única que permite diagnóstico definitivo pela demonstração de taquizoítos⁹⁻¹⁰, embora não seja obrigatória¹¹.

Pela impossibilidade de submeter os pacientes rotineiramente à biópsia cerebral, por ser procedimento invasivo, admite-se que a presença de múltiplas lesões captantes de contraste radiológico¹², associadas a resultado sorológico positivo para anticorpos antitoxoplasma¹³, aponta para a instituição de terapia específica, dada a alta morbimortalidade da doença⁷⁻⁸.

A resposta clínica a essa terapia tem sido o principal critério diagnóstico¹⁴, objetivando minimizar os danos neurológicos que podem advir do retardo no tratamento, implicando em seqüelas neurológicas incapacitantes ou mesmo na morte. Mesmo assim, a prática desta terapia empírica impõe alguns riscos, sobretudo a possibilidade de outros patógenos responderem à terapia antitoxoplasma (*Babesia sp* e *Nocardia sp*, por exemplo), além do retardo de outros diagnósticos que possam ter terapias específicas, como tuberculose e criptococose¹⁵. Por esse motivo se tem pesquisado a utilização de outros métodos diagnósticos complementares.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do *T. gondii* nos fluidos corporais tem sido utilizada com resultados promissores no diagnóstico das formas ocular, congênita, pulmonar e cerebral da toxoplasmose^{8,16}. Essa

técnica tem revolucionado o diagnóstico da infecção intrauterina pelo *T. gondii* por permitir uma definição clínica mais rápida, evitando o uso de procedimentos mais invasivos sobre o feto.

No caso da NT, os resultados do *Nested* PCR são controversos. Alguns estudos têm mostrado divergências atribuídas ao modo de extração do DNA, seleção dos *primers*, uso da enzima uracil-DNA-glicosilase com a finalidade de prevenir contaminação, comprimento dos fragmentos do PCR e uso de controle interno¹⁶.

A técnica de PCR em tempo real oferece como vantagens prover resultados mais rápidos e mais sensíveis, além da possibilidade de quantificação dos genes encontrados, fornecendo parâmetros que avaliam indiretamente a severidade da infecção e o prognóstico da evolução clínica¹⁷.

Dada a necessidade de detecção da infecção pelo *Toxoplasma gondii* no SNC em grupo de pacientes vulneráveis pela imunodeficiência, propõe-se estudo de validação fase III¹⁸, de detecção do DNA por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real para diagnóstico de neurotoxoplasmose em pacientes com aids.

Pacientes e Métodos

Foi realizado um estudo descritivo, transversal, de validação de teste diagnóstico, fase III. A pesquisa foi realizada em três serviços de referência em doenças neurológicas, na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil: Hospital da Restauração, Hospital Universitário Oswaldo Cruz e Hospital Correia Picano, no período de Fevereiro de 2006 a Dezembro de 2008.

A amostragem foi intencional, estratificada segundo diagnóstico presuntivo da doença neurológica. O tamanho amostral, para estudo de teste diagnóstico com variável dicotômica, foi baseado no cálculo preconizado por Flahault et al.¹⁹, adotando-se nível de confiança de 95%, sensibilidade esperada do teste igual a 85%, limite inferior mínimo do intervalo de confiança maior que 0,7, especificidade esperada de 95% e limite inferior do intervalo de confiança maior que 0,8. O tamanho amostral igualou-se a 85 casos e 50 controles.

Foram estudados 135 pacientes. No grupo I, foram incluídos 85 (63%) pacientes com AIDS e diagnóstico de neurotoxoplasmose, firmado pelos critérios do CDC, os quais incluem: (1) presença de anormalidade neurológica recente, consistente com doença intracraniana, (2) evidência de lesão cerebral com efeito de massa visibilizada por tomografia de crânio ou imagem por ressonância magnética e (3) sorologia sérica positiva para *Toxoplasma* ou resposta terapêutica positiva para toxoplasmose. Esses critérios foram utilizados como “padrão ouro” para comparação dos resultados do PCR *T. gondii*. No grupo II, foram estudados 50 (37%) pacientes com aids e manifestações neurológicas de etiologia não toxoplásmica.

Foram excluídos 10 pacientes porque, à época da coleta de material biológico para PCR, estavam em uso de terapia antitoxoplasma há mais de três dias, assim como cinco casos cuja história clínica sugeria recidiva recente de neurotoxoplasmose.

Para caracterização amostral, empregaram-se as variáveis referentes à: sexo, idade e presença de déficits neurológicos focais.

Amostras séricas foram obtidas para determinação de carga viral do HIV, contagem de CD4, CD8 e realização da pesquisa de IgG sérico para toxoplasmose por reação de ELISA.

Os exames de imagem por ressonância magnética encefálica foram realizados em aparelho da marca *General Electric*, modelo *Sigma Infinite* com 1,5 Tesla, obtendo-se seqüências convencionais multiplanares T1 e T2, pré e pós contraste, *Flair* e difusão.

Alíquotas de líquido cefalorraquiano foram coletadas por punção lombar, antes do início de terapia antitoxoplasma, para realização de provas imunológicas para infecções do SNC. As amostras foram armazenadas a 4°C.

Para realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real para detecção do *T. gondii*, empregou-se volume amostral de 1 mL de sangue e de líquido, processados em termociclador *iCicle* da Marca *Biorad*[®], acoplado a uma estação de trabalho operando o programa *PrimerExpress*.

O DNA foi extraído utilizando-se o kit *QIAmp DNA*, marca *Qiagen*[®], de acordo com as instruções do fabricante. A termociclagem iniciou-se pela desnaturação do DNA-alvo de dupla fita, por aquecimento a temperatura maior que 95°C, para promover a quebra das pontes de hidrogênio e liberação de

cadeias únicas de DNA-alvo, tornando-o acessível para hibridização com os *primers* específicos. Para hibridização, a amostra foi incubada com uma mistura contendo 12,5 µL de PCR *Master Mix Universal*, 5 pMol da sequência do primer TOXO-F (5'-TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3'), 5 pMol da sequência do reverso TOXO-R (5'-AGCGTTTCGTGGTCAACTATCGATTG-3') e 0,2 pMol de TaqMan probe (6FAM-TCTGTGCAACTTTGGTGTATTCGCAG-TAMRA), todos da marca *Applied Biosystem*® para amplificar a sequência específica de 98 pares de bases do gene B1. Após a ativação inicial da DNA polimerase *Amplitaq Gold* a 95°C por 10', foram realizados 50 ciclos de PCR a 99°C, por 15'', e a 60°C, por 1'. Para determinar o limite de detecção do método nos realizamos diluições seriadas do DNA *T. gondii*, de maneira que foi possível detecção de até 5 taquizoítos.

Na avaliação qualitativa da presença de DNA de *T. gondii*, foram consideradas positivas as amostras com fluorescência, cuja representação gráfica cruzou a linha de limiar acima da curva de PCR na fase exponencial. Foram utilizados controles positivos e negativos em todas as reações. Para controle interno positivo, foi empregada amostra de líquido amniótico de gestante com positividade de IgM para *T. gondii*. Para controle de inibição, empregou-se uma mistura do controle interno positivo com amostra de cada paciente, na proporção de 50%.

Os dados foram processados e validados com o programa Epi-Info, versão 6.04d, do CDC, e submetidos à análise estatística por meio do programa SPSS, versão 13.0. Foram utilizados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, razão de verossimilhança e respectivos intervalos de confiança em nível de significância de 0,05.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração envolvendo Seres Humanos, sendo protocolado sob número 00430.102.172/05.

Resultados

No grupo I obtivemos 43 homens e 42 mulheres, cuja média de idade igualou-se a $35,8 \pm 0,98$ anos. Houve déficit neurológico focal diagnosticado em 78 (91,8%) pacientes. Dentre 74 pacientes submetidos à pesquisa de IgG sérica antitoxoplasma pelo método ELISA, houve 72 (97,3%) positivos. A contagem média de linfócitos T CD4 foi $66,61 \pm 13,48$ células/mm³ de sangue (Tabela II.1).

Tabela II.1– Características demográficas, clínica e laboratoriais segundo grupos de estudo

Variáveis	Grupos	
	I	II
Sexo	(n=85)	(n=50)
Feminino	42 (49,4%)	13 (26%)
Masculino	43 (50,6%)	37 (74%)
Idade	(n=85)	(n=50)
Média $\pm$ erro da média	$35,8 \pm 0,98$	$38,6 \pm 1,5$
Sinal focal	(n=85)	(n=47)
Presença	78 (91,8%)	22 (46,8%)
Linfócitos T CD4	(n=36)	(n=15)
Média $\pm$ erro da média (células/mm ³)	$66,61 \pm 13,48$	$241,06 \pm 77,4$
Pesquisa de IgG sérica antitoxoplasma	(n=74)	(n=28)
Positiva	72 (97,3%)	28 (100,0%)
Negativa	2 (2,7%)	-
Número de lesões cerebrais à IRM	(n=64)	(n=18)
< 4	29 (45,3%)	16 (88,9%)
≥ 4	35 (54,7%)	2 (11,1%)

No grupo II, houve 12 casos de meningite criptocócica, 11 casos de meningite tuberculosa, dois casos de acidente vascular cerebral, três pacientes com encefalite pelo citomegalovírus e igual número de casos de linfoma do SNC. Quatro casos de neurosífilis, além de casos únicos de encefalite herpética, empiema subdural, leucoencefalopatia multifocal progressiva, demência por HIV e meningite pelo HIV. Dois pacientes tiveram ruptura de aneurisma intracraniano. Houve também oito casos de encefalopatias não definidas

O teste de PCR em tempo real em sangue revelou sensibilidade de 1,5% (IC95% 0,1% - 9,1%), especificidade igual a 100% (IC 95% 88,6% - 100%), valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 5,5% - 100%) e valor preditivo negativo de 36,5% (IC95% 27,5% - 46,6%).

A PCR em tempo real no líquido foi positiva em 30(22,2%) dos pacientes com encefalite toxoplásmica e em nenhum dos pacientes sem esta condição. A sensibilidade foi igual a 35,8% (IC95% 25,4% - 46,5%), especificidade igual a

100% (IC95% 91,1% - 100%), valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 85,9% - 100%) e valor preditivo negativo de 44,7% (IC 95% 37,9% - 57,5%).

Ao analisar os resultados de PCR no líquido em relação à celularidade líquórica, constatou-se que 89,7% dos pacientes com mais de quatro células/mm³ tiveram resultados positivos, contrapondo-se a 35,8% do grupo com até 3 células/mm³ no qual a PCR foi negativa ; diferença que foi significativa (p=0,013) (Tabela II.2).

Ao analisar os resultados de PCR no líquido em relação ao número de lesões encefálicas identificadas à ressonância magnética, observou-se que 54,3% dos pacientes com um total máximo de três lesões tiveram negatividade da PCR, enquanto que 73,9%, do grupo com quatro ou mais lesões intracranianas tiveram positividade da PCR, e esta diferença foi significativa (p=0,026) (Tabela II.2).

Tabela II.2– Distribuição da celularidade em líquido e do número de lesões encefálicas, segundo resultado da PCR em líquido

Variáveis	Resultado da PCR no LCR		Valor de p
	Positivo	negativo	
Celularidade em líquido	(n=29)	(n=53)	0,013
< 4 células/mm ³	3(10,3%)	19 (35,8%)	
≥ 4 células/mm ³	26 (89,7%)	34 (64,2%)	
Número de lesões à IRM	(n=23)	(n=46)	0,026
< 4 lesões	6 (26,1%)	25 (54,3%)	
≥ 4 lesões	17 (73,9%)	21 (45,7%)	

Discussão

O teste de PCR em tempo real no LCR mostrou baixa sensibilidade para o diagnóstico de toxoplasmose (35,8%) apesar de especificidade bastante elevada (100%). Os valores preditivos positivo de 100% e negativo de 44,7% mostram que o teste é útil para confirmar o diagnóstico quando o resultado é positivo, mas não o exclui no caso de o teste ser negativo.

A sensibilidade dos diferentes métodos de PCR para diagnóstico da NT varia de 13% a 100%^{20,21}. Tais variações parecem decorrer de dois problemas principais: a falta de homogeneidade entre os protocolos de PCR²⁰ e os tipos de *primers* utilizados^{15,22,23-24}. No primeiro caso, a partir do Segundo Estudo Colaborativo Europeu sobre PCR em gel de agarose²⁰, foram desenvolvidos

novos aparelhos e novas técnicas, incluindo a PCR em tempo real que oferece a vantagem de combinar a amplificação com a detecção dos produtos de amplificação (*amplicons*), no mesmo sistema fechado²⁵, tal como empregada nesta pesquisa.

Também foram realizadas modificações no preparo da amostra que permitiram evitar a contaminação desta por porfirinas e produtos de destruição do DNA do *Toxoplasma* antes da amplificação, que podem atuar como inibidores¹⁵. Na presente pesquisa essas modificações foram adotadas, pois tanto a detecção dos fragmentos de PCR como do DNA alvo ocorreram no mesmo tubo de reação, tornando improvável a possibilidade de contaminação com DNA estranho.

Outro aspecto técnico foi a padronização da extração do DNA²² para melhorar a sensibilidade do método. A partir da comparação de tempo e complexidade do processo laboratorial e sensibilidade analítica dos quatro métodos de extração do DNA do *T. gondii* em LCR, atualmente disponíveis, a extração por lise e centrifugação permitiu a detecção de até dois parasitas, com uma relação custo/benefício adequada a países em desenvolvimento²⁶. Na presente pesquisa, o método de extração por lise e centrifugação foi associado à retenção seletiva do DNA em coluna de sílica, com posterior eluição, reduzindo a possibilidade de contaminação da amostra e aumentando a chance de detecção do taquizoíto.

Quanto aos *primers*, muitos estudos têm relatado o potencial da PCR no líquido para detecção do gene do *T. gondii* em pacientes com aids e NT. A maioria destes utiliza *primers* para detecção do gene B1, pelo fato de se manter conservado e se repetir aproximadamente 30 vezes^{15,22,23-24}, mas algumas características técnicas podem comprometer a sensibilidade do método e dificultar a comparação de resultados. Os *primers* para detecção do gene B1 diferem porque não há padronização do método e esse gene é polimorfo, resultando em cepas genotipicamente diferentes encontradas na prática clínica²⁷. Além disso, variações de até 200 vezes na sensibilidade analítica com utilização de *primers* para detecção do gene B1 tem sido relatadas e este aspecto deve ser considerado na realização dessa metodologia²⁸.

Mais recentemente outras seqüências de amplificação de ácidos nucléicos, específicas para o *T. gondii* também têm sido investigadas, tais como RE²⁹, p30 e TGR1 18S rDNA³⁰, as quais poderão contribuir para o aumento da

sensibilidade do método. No entanto, com base nos resultados obtidos nas diversas pesquisas, o CDC considera a reação da PCR em LCR desanimadora³¹.

Um dos melhores resultados de PCR em LCR tem sensibilidade de 100%, cujas justificativas foram o envolvimento neurológico severo na maioria dos pacientes estudados e a alta prevalência da toxoplasmose no Brasil²¹. Essa argumentação dos autores não parece adequada já que praticamente todos os estudos avaliam esta metodologia em imunodeprimidos, com quadros severos, em países onde a soroprevalência de toxoplasmose é alta.

Para o aumento da sensibilidade da PCR no diagnóstico de NT, tem-se tentado associar a pesquisa em LCR a outro parâmetro, como PCR em sangue e dados clínicos. Estudo realizado em 2002 comprovou que a sensibilidade da PCR em líquido associada aos critérios diagnósticos do CDC aumenta de 70% para 100%, quando se consideram conjuntamente a análise sérica da PCR²³.

A excelente especificidade do teste, encontrada na presente pesquisa, se repete na maioria dos outros estudos^{7,27,32-33}, mostrando que ser um excelente marcador da presença da doença ativa e que a hipótese de recirculação de taquizoítos no líquido de paciente sem doença é improvável, visto que a positividade do teste não ocorreu nos pacientes sem o diagnóstico clínico de NT.

Dois aspectos nunca descritos e que parecem modificar a sensibilidade da PCR no LCR são o número de lesões e a celularidade no LCR. Os pacientes com quatro ou mais lesões, assim como aqueles com celularidade líquórica maior que três células tiveram maior positividade do teste. Os estudos de PCR em LCR referidos na literatura não consideraram esses aspectos, pois advogam que o comportamento encefalítico da doença seria um fator limitante na positividade do método. Ambos os parâmetros, maior celularidade líquórica e maior número de lesões, podem refletir uma resposta meníngea à circulação do taquizoíto, daí se associar à positividade da PCR.

O presente estudo mostrou que a PCR em tempo real no sangue tem pouco valor no diagnóstico da NT, com baixíssima sensibilidade (1,5%). Tal dado confirma índices de baixa sensibilidade do teste entre 13% e 25% de outros estudos^{27,32}, dando suporte à hipótese de reativação de doença restrita ao SNC³²⁻³³.

Concluindo, a PCR em tempo real no LCR, é um teste de baixa sensibilidade, mas sua elevada especificidade pode contribuir para o diagnóstico

da toxoplasmose cerebral. Maior número de lesões e maior celularidade líquórica podem melhorar a sensibilidade do método, enquanto que a realização do teste no sangue tem pouca utilidade.

Sugerimos que novas pesquisas correlacionem estes aspectos com os parâmetros de acurácia do método, testando a reprodutibilidade desses dados.

Os exames de PCR foram financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa, órgão de fomento à pesquisa, não havendo conflito de interesses.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para pesquisa envolvendo seres humanos do Hospital da Restauração (protocolo nº. 00430.102.172/05).

Os autores agradecem ao Dr. Ricardo Ximenes pela ajuda na análise do estudo.

Referências Bibliográficas

1. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002;8:634-640.
2. Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2004;39:1681-1691.
3. Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M. Manifestações neurológicas de toxoplasmose em AIDS. J Bras Doenças Sex Transm 2003;15:46-50.
4. Nissapatorn V, Lee C, Quek KF, Leong CL, Mahmud R, Abdullah KA. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: a current situation. Jpn J Infect Dis 2004; 57:160-165.
5. Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2002;34:103-115.
6. Schoeder PC, Post MJD, Oschatz E, Stadler A, Bruce-Gregorios J, Thurnher MM. Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishing central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. Neuroradiol 2006;48:715-720.
7. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. J Bras Patol Med Lab 2005; 41: 222-235.
8. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis 2002;185 (suppl 1):S73-S82.

9. Gonçalves-Ferreira AJ, Herculano-Carvalho M, Pimentel J. Stereotactic biopsies of focal brainstem lesions. *Surg Neurol* 2003;60:311-320.
10. Hornef MW, Iten A, Maeder P, Villemure JG, Regli L. Brain biopsy in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1999;159:2590-2596.
11. Hoffmann C. Opportunistic infections. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS, editors. *HIV Medicine*. 14th ed. Paris: Flying publisher; 2006. p. 406-411.
12. Batra A, Tripathi P, Gorthi SP. Magnetic resonance evolution of cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency. *Acta Radiol* 2004; 45:212-221.
13. Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol* 2005;43:5044-5047.
14. Chang L, Cornford ME, Chiang FL, Ernst TM, Sun NCJ, Miller BL. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. *AJNR* 1995;15:1653-1663.
15. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2421-2426.
16. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:941-945.
17. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time OCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4121-4125.
18. Sackett DL, Haynes RB. Evidence base of clinical diagnosis – the architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324:539-541.
19. Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol* 2005; 58:859-862.
20. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessièrès MH, Blatz R, et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters* 1998; 165:231.
21. Vidal JE, Colombo A, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:4765-4768.
22. Goto M, Takahashi T, Iwamoto A. Detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-1-infected Japanese patients with focal neurological signs. *J Intern Med Res* 2004;32:665-670.
23. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002;40:4499-4503

24. Reischl U, Bretagne S, Krüger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 2003;3:7
25. Cockerill FR^{3rd}. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:1112-1120
26. Alfonso Y, Fraga J, Cox R, Bandera F, Pomier O, Fonseca C, et al. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. *Med Sci Monit* 2008;14(3):MT1-6.
27. Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:505-511.
28. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46 : 1897-90.
29. Cassaing S, Bessi res MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44:720-724.
30. Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:120-124
31. Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Homes KK. Treating Opportunistic Infections among HIV Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2005;40:S131–S235.
32. Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:2639-2641.
33. Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart , et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. *AIDS* 1997;11:177-184.

7. CONCLUSÕES

Os resultados da PCR em tempo real para pesquisa do DNA *T.gondii* permitiram concluir que o método realizado no sangue não trouxe contribuições ao diagnóstico clínico. No LCR, houve baixa sensibilidade e alta especificidade, contribuindo para o diagnóstico de poucos casos.

A partir da observação empírica de que a presença de maior número de lesões e maior celularidade líquórica parecia se associar à positividade da PCR, buscou-se testar a hipótese por métodos estatísticos, confirmando que esses parâmetros devem ser valorizados porque melhoram a sensibilidade do método.

Outra constatação desse trabalho foi que a presença de lesões cerebrais únicas deve ser valorizada, apesar de não terem localização preferencial, porque não foram tão incomuns quanto referido na literatura, podendo se constituir em mais uma informação para auxiliar no diagnóstico de neurotoxoplasmose.

8. RECOMENDAÇÕES

A autora recomenda que os resultados de PCR em tempo real para diagnóstico de neurotoxoplasmose sejam analisados com cautela, pois a negatividade do método não exclui o diagnóstico, embora sua positividade auxilie na confirmação da doença.

Novos estudos de detecção do DNA *Toxoplasma gondii* deveriam incluir variáveis da doença na análise da acurácia do método, uma vez que estas poderão representar viés de espectro da doença.

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,....., fui informado(a) detalhadamente sobre a pesquisa intitulada: VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE PARA O DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM SIDA ., recebi da Dr^a. Carolina da Cunha Correia, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- 1) O paciente ou seu responsável declara que a referida médica, atendendo ao disposto nos artigos 56 e 59 do código de ética, sugeriu a realização de exame da reação de cadeia de polimerase para o diagnóstico de neurotoxoplasmose, apresentando informações detalhadas sobre os procedimentos a serem adotados no diagnóstico proposto para ser autorizado, consistindo em: obtenção de amostra de sangue e de líquido; sendo estes exames colhidos já de forma rotineira na investigação da minha doença. .
- 2) Que a importância deste estudo é o de identificar qual a contribuição diagnóstica que este método pode oferecer.
- 3) Que os procedimentos diagnósticos adotados não asseguram a garantia de cura e que a evolução da doença e o resultado do procedimento podem obrigar a Médica a modificar as condutas inicialmente propostas, sendo que, neste caso, fica a mesma, desde já, autorizada a tomar providências para tentar soluções dos problemas surgidos, segundo seu julgamento.
- 4) Que este estudo começará em fevereiro de 2006 e terminará em dezembro de 2007.
- 5) Certifico que fui informado sobre a natureza e características do procedimento diagnóstico, bem como dos resultados esperados e de outras possíveis alternativas de diagnóstico para esta doença, como também os possíveis riscos conhecidos, complicações e benefícios relativos ao procedimento proposto e às formas alternativas de diagnóstico, incluindo o não diagnóstico.
- 6) Que sempre que desejar, ser-me-ão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo
- 7) Ficou claro que as despesas serão cobertas pela Instituição Pública ou Privada; que tenho direito garantido de acesso aos documentos médicos relacionados ao procedimento e que eu poderei a qualquer momento recusar a continuar participando do estudo, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo
- 8) Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.
- 9) Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios, que a minha participação implica, concordo em dele participar e por isso eu DOU MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço da participante voluntária:

Domicílio _____ nº _____ Complemento _____ Bairro _____
 _____ CEP _____ Cidade _____ Fone _____

Endereço do responsável pela pesquisa

Hospital da Restauração, Avenida Agamenon Magalhães SN Derby Recife (PE)

Fone: (81) 34215444 Ramal 805 ou 803

Data: _____, ____/____/200

Assinatura ou impressão datiloscópica do(a) paciente ou responsável

Assinatura da Médica responsável pelo estudo

Apêndice B – Formulário de Pesquisa

Dr^a. Carolina da Cunha Correia

CLASSIFICAÇÃO NA PESQUISA		caso ☐	controle ☐	excluído ☐
REGISTRO:	1 NOME:			
2 ENDEREÇO:				
3 BAIRRO	4 CIDADE		5 UF:	6 FONE:
7 IDADE:				
8 SEXO: masculino ☐ feminino ☐		9 OCUPAÇÃO:		
10 PROCEDÊNCIA:				
11. INFORMANTE: paciente ☐ familiar ☐ via pública ☐ outro:				
INFORMAÇÕES À ADMISSÃO				
12 DATA DE ADMISSÃO: / /				
13 Tempo de diagnóstico de HIV		dias ☐	meses ☐	anos ☐ não sabe ☐
SINTOMAS				
14 INÍCIO (dias antes da admissão):				
15 FEBRE: não ☐ sim ☐		16. CEFALÉIA: não ☐ sim ☐		
17 CONVULSÃO : não ☐ sim ☐		18. ALTERAÇÃO MENTAL: não ☐ sim ☐		
19 DÉFICIT: não ☐ sim ☐ Especifique:				
20 ALTERAÇÃO DE SENSIBILIDADE: não ☐ sim ☐ Especifique:				
EXAME FÍSICO À ADMISSÃO				
21 SISTEMA PIRAMIDAL 1 ☐ 2 ☐				
22 CEREBELO 1 ☐ 2 ☐				
23 TRONCO CEREBRAL 1 ☐ 2 ☐				
24 SENSIBILIDADE 1 ☐ 2 ☐				
25 AFASIA 1 ☐ 2 ☐				
26 FUNDO DE OLHO papiledema não ☐ sim ☐				
27 FUNÇÕES MENTAIS 1 ☐ 2 ☐				
28 OUTROS 1 ☐ 2 ☐				
29 DISTÚRBO DE MOVIMENTO 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐				
EXAMES COMPLEMENTARES				
CONTROLE DE INFECÇÃO POR HIV				
30 CD4:		31 CD8:		32 CARGA VIRAL:
LIQUORRAQUIA				
33 células:	34 linfócitos	35 monócitos	36 eosinófilos	37 neutrófilos
38 proteínas	39 glicose:		40 cloretos	41. ADA:
42 pré-alb	43 albumina	44 alfa1	45 alfa2	46 beta1
				47 beta2
				48 gama
IMUNOLOGIA				
	REAGENTE POR ELISA		REAGENTE POR HEMAGLUTINAÇÃO	
	Sérico (A)	Liquórico (B)	Sérico (C)	Liquórico (D)
49 LUES	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
50 HERPES SIMPLEX	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
51 HERPES ZOSTER	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
52 CISTICERCOSE	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
53 CMV	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
54 CRIPTOCOCCUS	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título	não ☐ título
IMUNOLOGIA PARA TOXOPLASMOSE				
	REAGENTE POR ELISA		REAGENTE POR PCR	
	Sérico (A)	Liquórico (B)	Sérico (C)	Liquórico (D)
55. <i>T. gondii</i>			positivo ☐ negativo ☐	positivo ☐ negativo ☐
56 IgG	Não ☐ título	não ☐ título		

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA AO INTERNAMENTO	
57 Número de lesões	1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ > 4 ☐
58 Captação de contraste da lesão	Não ☐ sim ☐
59 Captação de contraste meníngea	Não ☐ sim ☐
60. Topografia	
61 Situação	Córtico-subcortical ☐ profunda ☐ ambas ☐
62 Hemisfério	direito ☐ esquerdo ☐ bilateral ☐
63 Difusão	restringe ☐ não restringe ☐
64 T1	Isointensa ☐ hipointensa ☐ hiperintensa ☐
65 T2	Isointensa ☐ hipointensa ☐ hiperintensa ☐
66 Flair	Isointensa ☐ hipointensa ☐ hiperintensa ☐
67 Edema	sim ☐ não ☐
68 Atrofia	sim ☐ não ☐
69 Hidrocefalia	sim ☐ não ☐
TRATAMENTO	
70 Início após quadro clínico	dias
71 Esquema	1 ^ª escolha ☐ 2 ^a escolha ☐ 3 ^a escolha ☐ Duração: dias
72 Corticóide	não ☐ sim ☐ duração: dias
73 Terapia antirretroviral	não ☐ sim ☐
CONDIÇÃO DE ALTA	
74 ALTA: ____/____/____	75 MOTIVO DE ALTA: curado ☐ melhorado ☐ piorado ☐ inalterado ☐ óbito ☐ transferência ☐

Apêndice C – Versão do Artigo I**SINGLE CEREBRAL LESION OF TOXOPLASMOTIC ORIGIN**

Carolina da Cunha Correia, MD, MSc¹

Heloísa Ramos Lacerda, MD, PhD²

Vláudia Maria de Assis Costa, PhD³

Alessandra Mertens Queiroz Brainer⁴

¹ Neurologist, postgraduate course in Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco

² Infectologist, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco

³ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco

⁴ Radiologist, Oswaldo Cruz Teaching Hospital, University of Pernambuco

Correspondence to:

Carolina da Cunha Correia

Rua Hermógenes de Moraes, 230, apto 1003, Madalena,
50610-160 Recife, Pernambuco, Brazil

Phone/Fax: +55 81 21268427

E-mail: carolina.dra@gmail.com

Abstract

Background: Cerebral lesions of toxoplasmic origin frequently are multiple but single lesions are not uncommon. **Purpose:** To describe the magnetic resonance findings in individuals with single cerebral lesions of toxoplasmodic origin. **Methods:** Sixty-one patients with cerebral toxoplasmosis and AIDS were included in a prospective study. Of these, 10 (16.4%) had a single cerebral lesion. Magnetic resonance images were obtained using a 1.5T device and the presumptive diagnosis of the disease was based on the criteria of the Centers for Disease Control. The lesions were analyzed regarding their location, signal intensity, type of enhancement after contrast, presence of eccentric target and meningeal uptake. **Results:** This series included four men and six women. The mean age was 35.9 ± 6.1 years. There were five cases with cortico-subcortical lesions and five cases with deep lesions, of which three (60%) had infratentorial locations; two of the latter were mesencephalic and the other cerebellar. In the T1 sequence, iso or hypointense signal patterns predominated, irrespective of the location of the lesion. In the T2 sequence, hyperintense signals predominated in deep lesions and signal variability in the cortical topography. Perilesional edema and ring contrast enhancement occurred in 100% of the cases, while eccentric targets and meningeal uptake were seen less frequently. **Conclusion:** Single cerebral toxoplasmosis lesions can occur both in cortico-subcortical and in deep regions. Iso or hypointense signal patterns in T1, perilesional edema and ring enhancement following contrast administration are highly suggestive of cerebral toxoplasmosis, even in the presence of single lesions on magnetic resonance.

Keywords: Cerebral toxoplasmosis, AIDS, Magnetic resonance image

Introduction

Cerebral toxoplasmosis is the most frequent opportunistic infection of the central nervous system (CNS) among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It is estimated that 30% to 50% of HIV-positive patients that are infected by *T. gondii* will develop cerebral toxoplasmosis¹⁻².

Amongst the neurological manifestations of cerebral toxoplasmosis, headaches and focal neurological deficits are the most frequent. However, reports of pleomorphic presentations are not uncommon³.

Current serological methods are not capable of differentiating between the latent phase of the infection and reactivation. Thus, the diagnosis is based on clinical and radiological characteristics, along with the therapeutic response after specific treatment⁴.

Magnetic resonance imaging (MRI) shows that around 70% of cerebral toxoplasmosis lesions are multifocal⁵ and located in the white substance or cortico-subcortical transition region. Typically, these lesions present hyperintense signal foci in T2 and hypo or isointense signal foci in T1, as well as ring contrast enhancement and circumjacent edema in T1 sequences⁶. However, there are occasions on which the cerebral lesion characteristics are unusual, thus making it difficult to diagnose them by imaging⁷.

Amongst these variations are single lesions. Although considered rare, they may be present in 14% to 17% of AIDS patients^{8,9}. While an image pattern suggestive of this diagnosis has already been established for multiple lesions, the existence of an imaging pattern for single lesions that might help in defining such cases is still being investigated. This variability of imaging patterns requires careful evaluation by neurologists, but must not be an obstacle to immediately instituting appropriate therapy.

The objective of this paper was to describe the MRI findings from individuals with single cerebral lesions of toxoplasmodic origin.

Patients and Methods

Between January 2006 and March 2008, 61 patients with a clinical diagnosis of cerebral toxoplasmosis and Aids were included in a prospective study. The patients were seen at two neurology referral services, located in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. Ten (16.4%) of these presented a single cerebral lesion, identified by MRI on the cranial segment.

The clinical suspicion of cerebral toxoplasmosis was based on the CDC criteria¹⁰, which include the following: recent onset of a focal neurological abnormality consistent with intracranial disease or reduction of consciousness level; evidence from cerebral imaging with mass effect and contrast uptake, detected on tomography or MRI, positive findings of anti-*Toxoplasma* serum IgG; and adequate therapeutic response.

MRI was performed using a 1.5 Tesla device (Phillips; Achieva model), with a high magnetic field, gradient coils of 33 milliTesla and circular polarization.

The protocol used included the following sequences: a) sagittal T1 “turbo spin-echo”, 6 mm in thickness (TR = 550, TE = 16) for better orientation of the subsequent images; b) axial T2 “turbo spin-echo”, 5 mm in thickness (TR = 550, TE = 110, matrix = 256x224, FOV = 23 cm); c) axial fluid attenuation inversion-recovery (FLAIR), 5 mm in thickness (TR = 11,000, TE = 140, matrix = 272x224, FOV = 25 cm); d) axial T2 gradient-echo (GRE), 5 mm in thickness (TR = 500, TE = 13, matrix = 256x192, FOV = 26 cm, flip angle = 20°); e) coronal T2 “turbo spin-echo”, 5 mm in thickness (TR = 550, TE = 110, matrix = 256x224, FOV = 23 cm). Venous gadopentate dimeglumine contrast (gadolinium) was used in the axial and coronal T1 spin-echo weighted sequences of 5 mm thickness (TR = 550, TE = 15, matrix = 256x224, FOV = 25).

The lesions were analyzed regarding their location, signal intensity, type of enhancement after contrast, presence of eccentric target and meningeal uptake.

Patients were reevaluated after a mean interval of 90 days and the cranial segment MRI was repeated to confirm lesion regression.

Results

This series comprised four men and six women. The mean age was 35.9 ± 6.1 years.

Analysis of the images obtained by conventional MRI on the ten individuals with a single cerebral lesion of toxoplasmodic origin showed that five were located in the cortico-subcortical region of the frontal, parietal and temporal lobes, and one of these was correlated with the meningeal plane (Figure C.1).

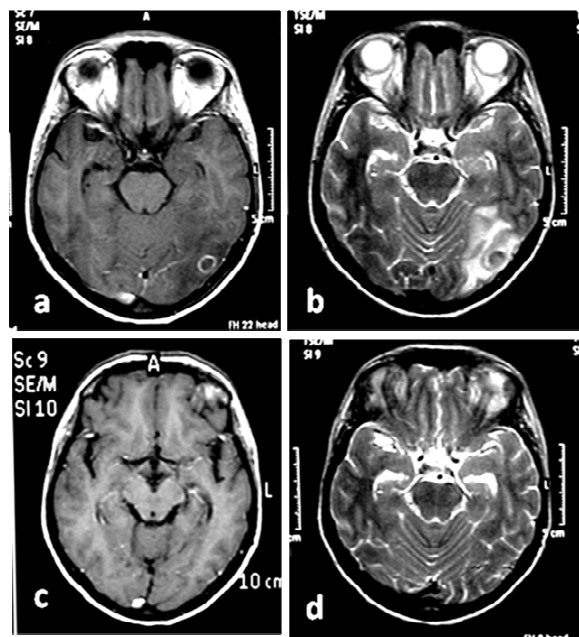


Figure C.1– Parietal lesion, correlated with the meningeal plane

Legend: a) and b) sequences before treatment; c) and d) sequences after treatment. Note disappearance of the lesion and edema

Images: author's photos

Of the five deep lesions, three (60%), had infratentorial locations, of which two were mesencephalic (Figure C.2) and the other was cerebellar. There was one thalamic lesion and one ganglion lesion (Figure C.3).

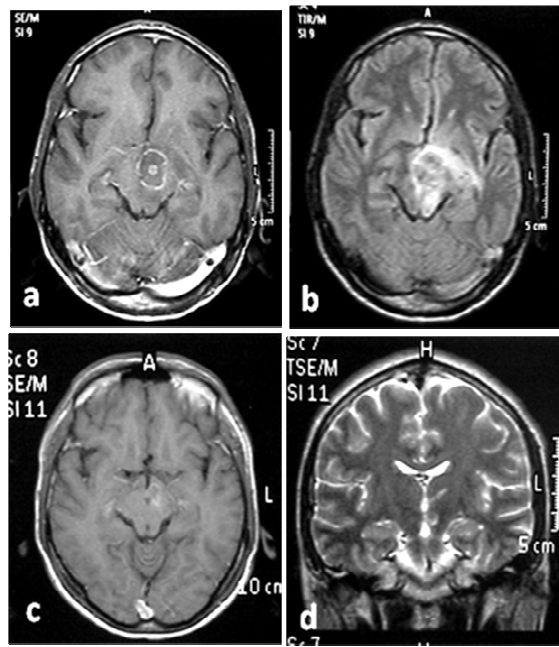


Figure C. 2– Mesencephalic lesion

Legend: a) and b) sequences before treatment; c) and d) sequences after treatment. Note reduction of the lesion and cerebral edema

Images: author's photos

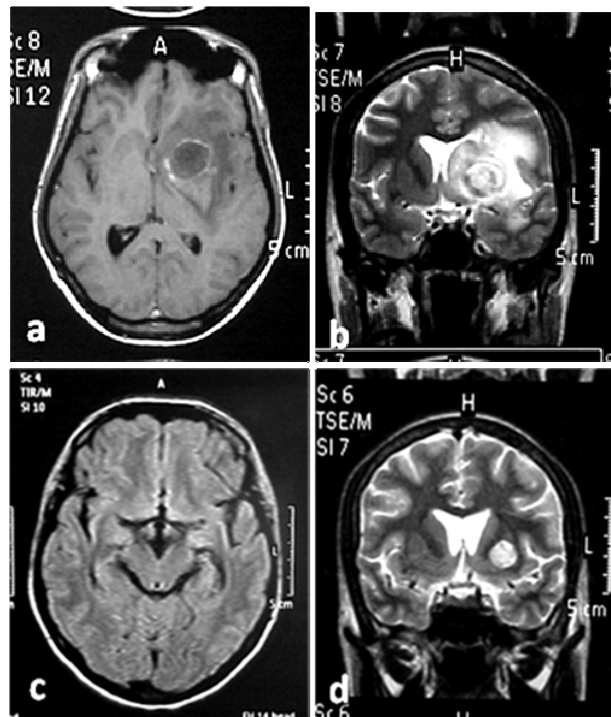


Figure C.3– Ganglion lesion with heterogeneous appearance in T2

Legend: a) and b) sequences before treatment; c) and d) sequences after treatment. Note calcification of the lesion. **Images:** author's photos

In the T1 sequence, the iso or hypointense signal pattern predominated. The T2 weighted sequences showed variable patterns of signal intensity; hyperintense signal or heterogeneous signal in deep lesions, hypointense signal in 50% of the cases of superficial lesions and perilesional edema in 100% of the cases.

In the Flair sequence, heterogeneous, iso, hypo or hyperintense signal patterns were present.

In the T1 sequence after contrast administration, there was enhancement of the lesions in all cases, with predominance of the ring pattern. Only one of the cases revealed an eccentric central target (Table 1).

Tabela 1 – Imaging characteristic of single lesions in cerebral toxoplasmosis cases, according to location

<i>Imaging characteristic</i>	<i>Location</i>	
	cortico-subcortical (n=5)	deep (n=5)
T1		
Iso or hypointense	100,0	60,0
Heterogeneous	-	20,0
Hyperintense	-	20,0
T2		
Hypointense	20,0	20,0
Heterogeneous	40,0	20,0
Hyperintense	40,0	60,0
Edema	100,0	100,0
Flair		
Hypointense	20,0	
Isointense	20,0	20,0
Heterogeneous	40,0	80,0
Hyperintense	20,0	-
Ring enhancement	100,0	100,0
Central target	-	20,0
Meningeal uptake	40,0	-

Discussion

Cerebral toxoplasmosis presents clinical and cerebrospinal fluid nonspecific signals. The clinical applicability of studies on the DNA of *Toxoplasma gondii*, using the polymerase chain reaction, is still under investigation. This makes it very important to be able to recognize cerebral toxoplasmosis patterns on MRI, performed at the initial stages of the clinical case.

The present study shows that the presence of a single lesion on MRI performed on individuals with cerebral toxoplasmosis is not unusual, since it occurred in 16.4% of the patients. The prevalence of iso or hypointense signal patterns in the T1 sequence, perilesional edema and ring enhancement after contrast administration were similar to what has been found in other studies^{6, 11}.

The positive predictive value of MRI for toxoplasmosis can reach 100% when multiple cerebral lesions are associated with a mass effect or contrast uptake, especially if at least one of the lesions is located in the basal ganglia or in the thalamus⁷.

The presence of single cerebral lesions of toxoplasmotic origin is infrequently mentioned in the literature^{8,9}. Thus, it was difficult to make comparisons with the findings of this study. Nonetheless, some aspects of the findings have been considered.

Unlike other studies that analyzed the behavior of cerebral toxoplasmosis lesions irrespective of their location, the present study sought to identify their characteristics by discriminating their locations.

Our findings of iso or hypointense signal predominance in the T1 sequence were repeated in both the cortico-subcortical lesions and in the deep lesions. Variations in the lesion signals from this sequence have been described, thus making it impossible to establish a diagnosis based exclusively on this data¹².

In studies in which the T2 sequence was analyzed, hyper or isointense signal patterns predominated^{13,14,15}. The same pattern described by those authors was present in our patients, but with one difference. The hyperintense pattern predominated in deep lesions and the presence of hypointense signal did not depend on the location of the lesion.

Even considering the prevalence of lesion intensity in T2 according to location, attention was drawn to the diversity of these lesions. This made it impossible to establish a pattern that might help in diagnosis based in this sequence.

The pattern variability in the T2 sequence may have been the result of evolutionary characteristics of the toxoplasmotic lesion. In a comparative study on MRI patterns and neuropathological findings, the presence of iso or hypointense signal was correlated with the phase of abscess formation, whereas liquefactive necrosis corresponded to the hyperintense signal of T2¹⁶.

Multifocal cerebral toxoplasmosis lesions in AIDS patients do not give rise to diagnostic difficulties. However, when there is a single cerebral lesion, differential diagnosis is necessary, especially with primary lymphoma of the central nervous system.

The aspects of our series that alerted us to the possibility of lesions of toxoplasmotic origin, in accordance with the pattern described by Berger¹⁷ that described some aspects in images who could help in dilemma between neurotoxoplasmosis and primary lymphoma of the SNC, as following: presence of marked edema (present in 100% of our cases); location in the cortico-subcortical transition (present in 50% of our sample of patients).

Analysis of the findings from conventional MRI sequences cannot distinguish cerebral toxoplasmosis from primary lymphoma of the CNS. The efforts that have been made to this end using additional methods, such as spectroscopy, diffusion or perfusion, have still not produced definitive answers¹⁸.

There were three cases of lesions with an inflammatory appearance in infratentorial locations. This led us to raise the possibility of toxoplasmotic granuloma, since primary lymphomas of the CNS in immunodepressed individuals generally have supratentorial and basal ganglia locations^{19,20}. Even if the intensity of the cerebral toxoplasmosis lesions is considered, this does not, by itself, allow a definitive diagnosis. An infratentorial location for the single lesion provides useful additional data for differentiating toxoplasmotic lesions from primary cerebral lymphoma. Since this differential diagnosis remains a dilemma¹⁷, any additional information may be valuable.

One of the main problems of this study was the lack of lesion biopsies. However, the clinical improvement of the patients over an average follow-up of 90 days after specific therapy makes us confident that the diagnosis was correct.

In summary, single lesions in cerebral toxoplasmosis cases can occur in both cortico-subcortical and deep regions. In deep lesions, the infratentorial location may assist in differentiation with lymphoma, since the latter is more common in supratentorial regions. The iso or hypointense signal patterns in T1, perilesional edema and ring enhancement after contrast administration are described in multiple lesions and are highly suggestive of cerebral toxoplasmosis, even in the presence of single lesions on MRI.

References

1. 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;40:4499-503.
2. DUPON M, CAZENAVE J, PELLEGRIN JL, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:2421-6.
3. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ E, ZAMORA F, BARNÉS J, et al. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral en pacientes cubanos con Sida. *Rev Neurol* 2002;34:618-21.
4. MEIRA CS, COSTA-SILVA TA, VIDAL JE, et al. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 2008;57:845-50.
5. CHANG L, CORNFORD ME, CHIANG FL, et al. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. *AJNR* 1995;15:1653-63.
6. MAEDA T, FUJII T, MATSUMURA T, et al. AIDS-related cerebral toxoplasmosis with hyperintense foci on T1-weighted MR images: a case report. *J Infect* 2006;53:e167-e170.
7. KHAN AN. Toxoplasmosis, CNS. eMedicine. Available at www.emedicine.com/radio/topic703.htm. Accessed on 10/06/2008.
8. CIRILLO SF, ROSENBLUM ML. Imaging of solitary lesions in AIDS. *J Neurosurg* 1991;74:1029.
9. PORTER SB, SANDE MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992;327:1643-8.
10. Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992;41(RR-17):1-19.

11. SUPIOT F, GUILLAUME MP, HERMANUS N, et al. Toxoplasma encephalitis in a HIV patient: unusual involvement of the corpus callosum. *Clin Neurol Neurosurg* 1997;99:287-90.
12. BRIGHTBILL TC, DONOVAN PMJ, HENSLEY GT, et al. MR of toxoplasma encephalitis: signal characteristics on T2 weighted images and pathologic correlation. *J Comp Assist Tomog* 1996;20:417-22.
13. KUPFER MC, ZEE CS, COLLETTI PM, et al. MRI evaluation of AIDS-related encephalopathy: toxoplasmosis vs lymphoma. *Magn Reson Imaging* 1990;8:51-7.
14. POST MJ, SHELDON JJ, HENSLEY GT, et al. Central nervous system disease in acquired immunodeficiency syndrome: prospective correlation using CT, MR imaging, and pathologic studies. *Radiology* 1986;158:141-14.
15. BATRA A, TRIPATHI P, GORTHI SP. Magnetic resonance evolution of cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency. *Acta Radiol* 2004;45:212-21.
16. NAVIA BA, PETITO CK, GOLD JWM, et al. Cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical and neuropathological findings in 27 patients. *Ann Neurol* 1986;19:224-38.
17. BERGER JR. Mass lesions of the brain in AIDS: the dilemmas of distinguishing toxoplasmosis from primary CNS lymphomas. *Am J Neuroradiol* 2003;24:554-5.
18. SCHOEDER PC, POST MJD, OSCHATZ E, et al. Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishing central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. *Neuroradiol* 2006;48:715-20.
19. OSBORN AG. *Diagnostic neuroradiology*. St. Louis: Mosby 1994:620-2.
20. HALDORSEN SI, KRÅKENES J, GOPLEN KA, et al. AIDS-related primary central nervous system lymphoma: a Norwegian national survey 1989–2003. *BMC Cancer* 2008;8:225.

Apêndice D – Versão do Artigo II

Influence of neurotoxoplasmosis characteristics on real-time PCR
sensitivity among AIDS patients

Carolina da Cunha Correia^{1,2}

Heloísa Ramos Lacerda^{1,3}

Vláudia Maria de Assis Costa¹

¹ Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco,
Brazil

² Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Brazil

³ Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Correspondence to:

Carolina da Cunha Correia

Rua Hermógenes de Moraes, 230, apto 1003, Madalena,
50610-160 Recife, Pernambuco, Brazil

Phone/Fax: +55 81 21268427

E-mail: carolina.dra@gmail.com

Abstract

Cerebral toxoplasmosis among individuals with AIDS may be difficult to diagnose, and needs to be differentiated from other neurological diseases. We performed a validation study on the real-time polymerase chain reaction (PCR) for detecting the B1 gene of *Toxoplasma gondii* in the blood and cerebrospinal fluid of AIDS patients with cerebral toxoplasmosis. Were studied 135 AIDS patients, divided into two groups. Group I comprised 85 patients with neurotoxoplasmosis; Group II comprised 50 patients with neurological non-toxoplasmic diseases. Real-time PCR on blood revealed sensitivity of 1.5%, specificity of 100.0%, positive predictive value of 100.0% and negative predictive value of 34.3%. Cerebrospinal fluid testing produced better results: sensitivity of 35.8%, specificity of 100.0%, positive predictive value of 100.0% and negative predictive value of 44.7%. The group presenting with pleocytosis and four or more encephalic lesions was associated with greater cerebrospinal fluid positivity on PCR. We concluded that real-time PCR on blood was not useful for diagnosis. Cerebrospinal fluid testing showed low sensitivity but high specificity. Greater numbers of lesions and greater cerebrospinal fluid cellularity may improve the sensitivity of the method.

Descriptors: Cerebral toxoplasmosis. Diagnosis. Polymerase chain reaction.

Introduction

Cerebral toxoplasmosis is usually caused by reactivation of the latent cystic form of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system (CNS)¹. Among patients with the human immunodeficiency virus (HIV), this disease is a sign of severe immunological depletion and, if not treated, invariably leads to death^{2,3,4}.

Even though this neurological disease is seen frequently, atypical presentations may occur. These require differential diagnosis with other neurological infections and tumoral diseases, especially in relation to the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The neurological complications of AIDS are even more varied, due to the neurotrophic action of the virus or opportunistic infections⁵. Thus, the clinical management of neurotoxoplasmosis is dependent on complementary methods, including imaging⁶, immunological tests on blood and cerebrospinal fluid^{7,8} and cerebral biopsy. Cerebral biopsy is the only method that enables a definitive diagnosis, by demonstrating the presence of tachyzoites^{9,10}, although it is not obligatory to perform such biopsies¹¹.

It is not possible to routinely subject patients to cerebral biopsy, because it is an invasive procedure. It is therefore accepted that the presence of multiple lesions with radiological contrast uptake¹², in association with a positive serological findings of anti-*Toxoplasma* antibodies¹³, is an indication for instituting specific therapy, given the high morbidity and mortality of the disease^{7,8}.

The clinical response to this therapy is the main diagnostic criterion¹⁴. The aim in such therapy is to minimize the neurological damage that may result from delays in treatment, which could give rise to incapacitating neurological sequelae or even death. Even so, implementing this empirical therapy carries some risks, especially the possibility that other pathogens might respond to anti-*Toxoplasma* therapy (*Babesia sp* and *Nocardia sp*, for example). It may also delay other diagnoses for which specific therapies exist, such as tuberculosis and cryptococcosis¹⁵. For this reason, the use of other complementary diagnostic methods has been investigated.

The polymerase chain reaction (PCR) for detecting *T. gondii* in body fluids has been used with promising results in relation to the ocular, congenital, pulmonary and cerebral forms of toxoplasmosis^{8,16}. This technique has revolutionized the diagnosing of intrauterine infection by *T. gondii*, since it allows faster clinical definition and thus avoids the use of more invasive procedures on the fetus.

With regard to cerebral toxoplasmosis, the results from nested PCR are controversial. The divergences presented have been attributed to differences in

DNA extraction methods, primer selection, uracil-DNA-glycosidase enzyme use (with the aim of preventing contamination), PCR fragment lengths and internal control use¹⁶.

The real-time PCR technique offers the advantage of promoting faster and more sensitive results, along with the possibility of quantifying the genes encountered. It provides parameters that indirectly evaluate the severity of the infection and the prognosis for the clinical evolution¹⁷.

Given the need to detect *Toxoplasma gondii* infection in the CNS among patient groups that are vulnerable due to immunodeficiency, a phase III validation study¹⁸ was proposed. Its aim was to detect DNA by using real-time PCR in order to diagnose neurotoxoplasmosis among Aids patients.

Patients and Methods

A phase III cross-sectional descriptive study was performed to validate a diagnostic test. The research was conducted in three referral services for neurological diseases in the city of Recife, Pernambuco, Brazil: Hospital da Restauração, Hospital Universitário Oswaldo Cruz and Hospital Correia Picanço, between February 2006 and October 2008.

The sampling was intentional, stratified according to the presumptive diagnosis of the neurological disease. The sample size, for this diagnostic test study with a dichotomous variable, was based on the calculation recommended by Flahault et al.¹⁹, taking a confidence level of 95%, expected test sensitivity of 85% (with minimum lower limit of the confidence interval greater than 0.7) and expected specificity of 95% (with lower limit of the confidence interval greater than 0.8). The sample size thus calculated was 85 cases and 50 controls.

One hundred and thirty-five patients were studied. Group I comprised 85 AIDS patients (63%) with a diagnosis of neurotoxoplasmosis in accordance with the CDC criteria, which include: (1) presence of a recent neurological abnormality, consistent with intracranial disease; (2) evidence of a cerebral lesion with mass effect, as detected on cranial tomography or magnetic resonance imaging; and (3) positive serological findings of *Toxoplasma* and positive response to therapy for toxoplasmosis. These criteria were used as the

“gold standard” for comparison with the results from *T. gondii* PCR. Group II comprised 50 AIDS patients (37.0%) with neurological manifestations of non-toxoplasmotic etiology.

Ten patients were excluded because, at the time when the biological material for PCR was collected, they had been undergoing anti-*Toxoplasma* therapy for more than three days. Another five cases were excluded because their clinical histories suggested that their neurotoxoplasmosis was a recent recurrence.

To characterize the sample, variables relating to gender, age and the presence of focal neurological deficits were used.

Serum samples were obtained to determine the HIV viral load and CD4 and CD8 counts, and to investigate serum IgG for toxoplasmosis by means of the ELISA reaction.

Encephalic magnetic resonance imaging examinations were performed using a 1.5 Tesla device (General Electric; Sigma Infinite model), to obtain multiplanar conventional T1 and T2 sequences, before and after contrast, Flair and diffusion.

Aliquots of cerebrospinal fluid were collected by means of lumbar puncture, before starting the anti-*Toxoplasma* therapy, in order to perform immunological tests for CNS infections. The samples were stored at 4°C.

To carry out real-time PCR for *T. gondii* detection, sample volumes of 1 ml of blood and 1 ml of cerebrospinal fluid were used. These were processed in a thermocycler (Biorad®; iCycle model), coupled to a workstation operating the PrimerExpress software.

DNA was extracted using the QIAmp DNA kit (Qiagen®), in accordance with the manufacturer's instructions. The thermocycling began by denaturing the target double-strand DNA, heating to a temperature greater than 95°C to cause the breaking of hydrogen bonds and release of single chains of target DNA, thereby making the DNA accessible for hybridization with the specific primers. For hybridization, the sample was incubated with a mixture containing 12.5 µl of PCR Master Mix Universal, 5 pMol of the primer sequence TOXO-F (5'-TCCCCTCTGCTGGCGAAAAGT-3'), 5 pMol of the reverse sequence TOXO-R (5'-AGCGTTCGTGGTCAACTATCGATTG-3') and 0.2 pMol of TaqMan probe (6FAM-TCTGTGCAACTTTGGTGTATTTCGCAG-TAMRA), all

from Applied Biosystems®. This mixture was used to amplify the specific sequence of 98 base pairs of the B1 gene. After the initial activation of the DNA polymerase using Amplitaq Gold at 95°C for 10', 50 cycles of PCR at 99°C for 15'' and at 60°C for 1' were performed. To determine the detection limit of our method we performed a serial dilution of *T. gondii* DNA and it was able to detect a minimum of 5 tachyzoites.

In qualitatively evaluating the presence of *T. gondii* DNA, the samples with fluorescence for which the graphical representation crossed the threshold line above the PCR curve in the exponential phase were considered positive. Positive and negative controls were used in all reactions. The positive internal control was a sample of amniotic fluid from a pregnant woman with IgM positive for *T. gondii*. For the inhibition control, a mixture of the positive internal control with a sample from each patient, in proportions of 50:50, was used.

The data was processed and validated using the Epi-Info software, version 6.04d (CDC), and subjected to statistical analysis using the SPSS software, version 13.0. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and respective confidence intervals at the significance level of 0.05 were used.

Results

Group I, composed of patients with neurotoxoplasmosis, was characterized by 43 men and 42 women, mean age of $35,8 \pm 0,98$ years and focal neurological diagnosis deficit at diagnosis, which was found in 78 patients (91,8%). Of the 74 patients with anti-Toxoplasma serology, 72 (97,3%) were positive in the test, identified by the ELISA method. The mean CD4 T-lymphocyte count was 66.61 ± 13.48 cells/mm³ of blood (Table 1).

Table 1– Demographic, clinical and laboratory characteristics according to study group

Variable	Group	
	I	II
Gender	(n = 85)	(n = 50)
Female	42 (49,4%)	13 (26%)
Male	43 (50,6%)	37 (74%)
Age	(n = 85)	(n = 50)
Mean $\pm$ mean error	35,8 $\pm$ 0,98	38,6 $\pm$ 1,5
Focal sign	(n=85)	(n=47)
Presence	78 (91,8%)	22 (46,8%)
CD4 T-lymphocytes	(n = 36)	(n = 15)
Mean $\pm$ mean error (cells/mm ³)	66,61 $\pm$ 13,48	241,06 $\pm$ 77,4
Serum IgG anti-Toxoplasma investigation	(n = 74)	(n = 28)
Positive	72 (97, 3%)	28 (100,0%)
Negative	2 (2.7%)	-
Number of cerebral lesions seen on magnetic resonance imaging	(n = 64)	(n = 18)
< 4	29 (45.3%)	16 (88.9%)
$\geq$ 4	35 (54.7%)	2 (11.1%)

Group II, composed of patients without neurotoxoplasmosis, had 12 cases of cryptococcal meningitis, 11 cases of tuberculosis meningitis, two cases of stroke and three cases of cytomegalovirus encephalitis. There were also three cases of CNS lymphoma, four cases of neurosyphilis and single cases of herpetic encephalitis, subdural empyema, HIV dementia, HIV meningitis, progressive multifocal leukoencephalopathy. Two cases of intracranial aneurism and there were also eight cases of undefined encephalopathy.

The real-time PCR test on blood was positive for only one of the neurotoxoplasmosis patients and for none of the patients without neurotoxoplasmosis. Thus, the sensitivity was 1.5% (95% CI: 0.1% - 9.1%), specificity was 100.0% (95% CI: 88,6% - 100.0%), positive predictive value was 100.0% (95% CI: 5.5% - 100.0%) and negative predictive value was 36,5% (95% CI: 27.5% - 46,6%).

The real-time PCR test on cerebrospinal fluid was positive for thirty (22,2%) of the patients with toxoplasmotic encephalitis and for none of the patients without neurotoxoplasmosis. Thus, the sensitivity was 35.8% (95% CI: 25.4% - 46.5%), specificity was 100.0% (95% CI: 91,1% - 100.0%), positive predictive value was 100.0% (95% CI: 85.9% - 100.0%) and negative predictive value was 44.7% (95% CI: 37.9% - 57,5%).

Analysis of the PCR results from cerebrospinal fluid in relation to cellularity showed that 89.7% of the patients with four or more cells/mm³ had positive results, in contrast with 35.8% of the group with up to three cells/mm³. This was a significant difference ($p = 0.013$) (Table 2).

Table 2– Distribution of cellularity of cerebrospinal fluid and number of encephalic lesions, according to the PCR result from cerebrospinal fluid

Variable	PCR on cerebrospinal fluid		p value
	Positive	Negative	
Cellularity of cerebrospinal fluid	(n = 29)	(n = 53)	0.013
< 4 cells/mm ³	3 (10,3%)	19 (35,8%)	
≥ 4 cells/mm ³	26 (89,7%)	34 (64,2%)	
Number of lesions seen on magnetic resonance imaging	(n = 23)	(n = 46)	0.026
< 4 lesions	6 (26,1%)	25 (54,3%)	
≥ 4 lesions	17 (73,9%)	21 (45,7%)	

Analysis of the PCR results from cerebrospinal fluid in relation to the number of encephalic lesions identified from magnetic resonance imaging showed that 54.3% of the patients with a maximum of three lesions were negative on PCR, while 73.9% of the group with four or more intracranial lesions were positive on PCR. This difference was significant ($p = 0.026$) (Table 2).

Discussion

Real-time PCR on cerebrospinal fluid showed low sensitivity for diagnosing toxoplasmosis (35.8%), although its specificity was very high (100.0%). The positive predictive value of 100.0% and negative predictive value of 44.7% showed that the test is useful for confirming the diagnosis when the result is positive, but does not rule out this diagnosis if the test is negative.

The sensitivity of the different PCR methods for diagnosing cerebral toxoplasmosis ranges from 13% to 100%^{20,21}. These variations seem to result from two main problems: lack of homogeneity between PCR protocols²⁰ and the primers types used^{15,22,23-24}. With regard to homogeneity, the Second European Collaborative Study on PCR on agarose gel²⁰ gave rise to the development of new equipment and new techniques, including real-time PCR. This technique offers the advantage of combining the amplification with the detection of amplification products (amplicons), within the same closed system²⁵, as used in the present study.

Modifications to sample preparation were also developed, to make it possible to avoid sample contamination by porphyrins and the destruction products from *Toxoplasma* DNA, before the amplification, which may act as inhibitors¹⁵. In the present study, these modifications were used because detection of both the PCR fragments and the target DNA occurred in the same reaction tube. This technique made contamination by foreign DNA unlikely.

Another technical feature that has been developed is standardization of DNA extraction²² to improve the sensitivity of the method. A comparison between the four *T. gondii* DNA extraction methods from cerebrospinal fluid that are currently available, in terms of the time taken by and complexity of the laboratory process and the analytical sensitivity, shows that extraction by lysis and centrifugation enables detection of up to two parasites with a cost/benefit relationship appropriate for developing countries²⁶. In the present study, the extraction method via lysis and centrifugation was used in association with selective retention of DNA in a silica column, with subsequent elution. This reduced the possibility of sample contamination, thereby increasing the chances of tachyzoite detection.

With regard to the *primers*, many studies have reported the potential of PCR on cerebrospinal fluid for detecting the *T. gondii* gene in AIDS and cerebral toxoplasmosis patients. Most of these studies used *primers* to detect the B1 gene, because this gene is conserved and approximately 30 repeats can be done^{15,22,23,24}. However, certain technical characteristics may compromise the sensitivity of the method and make it difficult to compare results. The *primers* for detecting the B1 gene differ because there is no standardization of the method and this gene is polymorphous, thus resulting in the strains with different genotypes that are found in clinical practice²⁷. Besides this, variation by 200 fold factor in analytical sensitivities of *primers* to target to B1 gene has been reported and this point must be considered in the performance of the method²⁸.

More recently, other nucleic acid amplification sequences that are specific for *T. gondii* have also been investigated, such as RE²⁹, p30 and TGR1 18S rDNA³⁰. These may contribute towards increasing the sensitivity of the method. However, based on the results obtained from several studies, CDC considers the PCR reaction on cerebrospinal fluid discouraging³¹.

One of the best results from PCR on cerebrospinal fluid produced a sensitivity of 100%. This was explained by the severe neurological impairment of most of the patients studied and the high prevalence of toxoplasmosis in Brazil²¹. Those authors' arguments do not seem to be applicable, given that practically all such studies have evaluated this methodology on immunodepressed patients presenting severe conditions in countries where toxoplasmosis seroprevalence is high.

To increase the sensitivity of PCR for diagnosing cerebral toxoplasmosis, attempts have been made to associate the cerebrospinal fluid investigation with another parameter, such as PCR on blood samples or clinical data. A study performed in 2002 found that the sensitivity of PCR on cerebrospinal fluid associated with the CDC diagnostic criteria increased from 70% to 100%, when considered together with serum analysis via PCR²³.

The excellent specificity of the test that was found in the present investigation was also found in most of the other studies^{7,27,32-33}. This shows that the test is an excellent marker for the presence of active disease and that the hypothesis of recirculation of tachyzoites in the cerebrospinal fluid of

patients without the disease is unlikely, given that patients without the clinical diagnosis of cerebral toxoplasmosis did not produce positive test results.

Two findings from the present study that have never previously been described and which seem to modify the sensitivity of PCR on cerebrospinal fluid are the number of lesions and the cellularity of the cerebrospinal fluid. Patients with four or more lesions and those with cerebrospinal fluid cellularity greater than three cells presented greater positivity in the test. The PCR studies on cerebrospinal fluid reported in the literature did not consider these characteristics, since they take the view that the encephalitic behavior of the disease would be a limiting factor on positive results from the method. Both the greater cerebrospinal fluid cellularity and the greater number of lesions may reflect a meningeal response to tachyzoite circulation, thereby giving rise to positive results from the PCR.

The present study showed that real-time PCR on blood has little value for diagnosing cerebral toxoplasmosis, displaying very low sensitivity (1.5%). This confirms the low sensitivity rates for this test found in other studies, ranging from 13% to 25%^{27,32}, and supports the hypothesis of reactivated disease restricted to the CNS^{32,33}.

In conclusion, real-time PCR on cerebrospinal fluid is a test with low sensitivity, but their high specificity may contribute for diagnosing cerebral toxoplasmosis. Greater numbers of lesions and greater cerebrospinal fluid cellularity may enhance the sensitivity of the method, while performing the test on blood has little usefulness.

New studies should be conducted to correlate these characteristics with the accuracy parameters of the method and to test the reproducibility of these data.

Acknowledgments

This work received financial support from Brazilian National Research Council (CNPq), a body for promoting research, and there were no conflicts of interest.

I thank Dr Ricardo Ximenes for helping in the analysis of this study.

This study was approved by the Hospital da Restauração Ethics Committee for Research involving Human Beings (protocol number 00430.102.172/05).

References

1. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect 2002;8:634-640.
2. Antinori A, Larussa D, Cingolani A, Lorenzini P, Bossolasco S, Finazzi MG, et al. Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis 2004;39:1681-1691.
3. Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M. Manifestações neurológicas de toxoplasmose em AIDS. J Bras Doenças Sex Transm 2003;15:46-50.
4. Nissapatorn V, Lee C, Quek KF, Leong CL, Mahmud R, Abdullah KA. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: a current situation. Jpn J Infect Dis 2004; 57:160-165.
5. Skiest DJ. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2002;34:103-115.
6. Schoeder PC, Post MJD, Oschatz E, Stadler A, Bruce-Gregorios J, Thurnher MM. Analysis of the utility of diffusion-weighted MRI and apparent diffusion coefficient values in distinguishing central nervous system toxoplasmosis from lymphoma. Neuroradiol 2006;48:715-720.
7. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. J Bras Patol Med Lab 2005; 41: 222-235.
8. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. J Infect Dis 2002;185 (suppl 1):S73-S82.
9. Gonçalves-Ferreira AJ, Herculano-Carvalho M, Pimentel J. Stereotactic biopsies of focal brainstem lesions. Surg Neurol 2003;60:311-320.

10. Hornef MW, Iten A, Maeder P, Villemure JG, Regli L. Brain biopsy in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 1999;159:2590-2596.
11. Hoffmann C. Opportunistic infections. In: Hoffmann C, Rockstroh JK, Kamps BS, editors. *HIV Medicine*. 14th ed. Paris: Flying publisher; 2006. p. 406-411.
12. Batra A, Tripathi P, Gorthi SP. Magnetic resonance evolution of cerebral toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency. *Acta Radiol* 2004; 45:212-221.
13. Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, et al. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *J Clin Microbiol* 2005;43:5044-5047.
14. Chang L, Cornford ME, Chiang FL, Ernst TM, Sun NCJ, Miller BL. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. *AJNR* 1995;15:1653-1663.
15. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2421-2426.
16. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:941-945.
17. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time OCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 2000;38:4121-4125.
18. Sackett DL, Haynes RB. Evidence base of clinical diagnosis – the architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002;324:539-541.
19. Flahault A, Cadilhac M, Thomas G. Sample size calculation should be performed for design accuracy in diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol* 2005; 58:859-862.
20. Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessi eres MH, Blatz R, et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters* 1998; 165:231.
21. Vidal JE, Colombo A, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:4765-4768.
22. Goto M, Takahashi T, Iwamoto A. Detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-1-infected Japanese patients with focal neurological signs. *J Intern Med Res* 2004;32:665-670.
23. Joseph P, Calder on MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol* 2002;40:4499-4503.
24. Reischl U, Bretagne S, Kr ger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 2003;3:7.

25. Cockerill FR^{3rd}. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Arch Pathol Lab Med 2003;127:1112-1120
26. Alfonso Y, Fraga J, Cox R, Bandera F, Pomier O, Fonseca C, et al. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. Med Sci Monit 2008;14(3):MT1-6.
27. Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. Clin Microbiol Infect 2003;9:505-511.
28. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. J Clin Microbiol 2008; 46 : 1897-90.
29. Cassaing S, Bessi res MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006;44:720-724.
30. Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok, H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. Clin Microbiol Infect 2001;7:120-124
- 31 Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Homes KK. Treating Opportunistic Infections among HIV Infected Adults and Adolescents: Recommendations from CDC, the National Institutes of Health and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2005;40:S131–S235.
32. Franzen C, Altfeld M, Hegener P, Hartmann P, Arendt G, Jablonowski H, et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol 1997;35:2639-2641.
33. Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart , et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. AIDS 1997;11:177-184.

ANEXO

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Av. Agamenon Magalhães, s/n
5º andar, Derby, Recife-PE
CEP 52020-000 - Telefax: (81) 3421-5694

PARECER

Após avaliação do projeto intitulado de: **VALIDAÇÃO DA REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE PARA O DIAGNÓSTICO DE NEUROTOXOPLASMOSE EM PACIENTES COM SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA**, O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração em reunião realizada em 12/09/05 emite parecer favorável, **CAAE – 0043.0.102.172-05**.

Pesquisador(es): **CAROLINA DA CUNHA CORREIA**

Recife, 20 de setembro de 2005.


Prof. Dr. Josimário Silva
Coordenador do CEP-HR

Referências Bibliográficas

Apresentação

1. NISSAPATORN, V.; LEE, C.; QUEK, K. F.; LEONG, C. L.; MAHMUD, R.; ABDULLAH, K. A. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: a current situation. **Jpn J Infect Dis**, v. 57, p. 160-165, 2004.
2. VIDAL, JE. Toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS. **Prática Hospitalar**, n.42, 2005. <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2042/pgs/materia%2022-42.html>. Acesso em 30/01/2008.
3. RAFFI, F.; ABOULKER, J.; MICHELET, C. et al. A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. **AIDS**, v. 11, p. 177-184, 1997.
4. CHANG, L.; CORNFORD, M. E.; CHIANG, F. L. et al. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. **AJNR**, v. 15, p. 1653-1663, 1995.
5. DUPON, M.; CAZENAVE, J.; PELLEGRIN J. L.; et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and Tissue Culture in Cerebrospinal Fluid and Blood of Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients. **J Clin Microbiol**, v. 33, n.9, p. 2421-2426, 1995.
6. REMINGTON, J.S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.
7. MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 185, suppl 1, p. S73-S82, 2002.
8. ROMAND, S.; WALLON, M.; FRANCK, J.; THULLIEZ, P.; PEYRON, F.; DUMON, H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. **Obstet Gynecol.**, v. 97, p. 296-300, 2001.
9. ALFONSO, Y.; FRAGA, J.; COX, R.; et al. Comparison of four DNA extraction methods from cerebrospinal fluid for the detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in AIDS patients. **Med Sci Monit**, v. 14, n. 3, p. 1-6, 2008.
10. JOSEPH, P.; CALDERÓN, M. M.; GILMAN, R. H.; et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4499-4503, 2002.
11. KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, p. 229-35, 2005.
12. VIDAL, J. E.; COLOMBO, A.; OLIVEIRA, A. C. P.; FOCACCIA, R.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4765-4768, 2004.

- 13 FRANZEN, C.; ALTFELD, M.; HEGENER, P.; et al. Limited value of PCR for detection of *Toxoplasma gondii* in blood from human immunodeficiency virus-infected patients. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 10, p. 2639-2641, 1997.
14. LIN, M. H.; CHEN, T. C.; KUO, T. T.; TSENG, C. C.; TSENG, C. P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4121-4125, 2000.
15. SACKETT, D.L.; HAYNES, R.B. Evidence base of clinical diagnosis – The architecture of diagnostic research. **BMJ**, v. 324, p. 539-541, 2002.

Referencial Teórico

1. NISSAPATORN, V.; LEE, C.; QUEK, K. F.; LEONG, C. L.; MAHMUD, R.; ABDULLAH, K. A. Toxoplasmosis in HIV/AIDS patients: a current situation. **J Infect Dis Jpn**, v. 57, p. 160-165, 2004.
2. BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, L. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G.; et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 55-62, 2003.
3. COELHO, R. A. L.; KOBAYASHI, M.; CARVALHO, L. B. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 45, p. 229-231, 2003.
4. MONTOYA, J. G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. **J Infect Dis**, v. 185, suppl 1, p. S73-S82, 2002.
5. JOSEPH, P.; CALDERÓN, M. M.; GILMAN, R. H.; et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 12, p. 4499-4503, 2002.
6. DUPON, M.; CAZENAVE, J.; PELLEGRIN, J. L.; RAGNAUD, J. M.; CHEYROU, A.; FISCHER, I.; et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2421-2426, 1995.
7. SCHLÜTER, D.; KNOK, L. Y.; LÜTJEN, S.; SOLTEK, S.; HOFFMANN, S.; KÖRNER, H.; et al. Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. **J Immunol**, v. 170, p. 6172-6182, 2003.
8. SKIEST, D. J. Focal neurological disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 103-115, 2002.
9. SUZUKI, Y. Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. **J Infect Dis**, v. 185, suppl 1, p. S58-S65, 2002.
10. PALM, C.; TUMANI, H.; PIETZCKER, T.; BENDEL, D. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis by detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in cerebrospinal fluid. **J Neurol**, v. 255, p. 939-941, 2008.

11. GILDENBERG, P. L.; GATHE, J. C Jr, KIM, J. H. Stereotactic biopsy of cerebral lesions in AIDS. **Clin Infect Dis**; v. 30, p. 491, 2000.
12. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 41, n. RR 17, p. 1-19, 1992.
13. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E.; ZAMORA, F.; BARNÉS, J.; BENDER, J. E.; RODRÍGUEZ-DELGADO, F.; MILLÁN-MARCELO, J. C. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral en pacientes cubanos con sida. **Rev Neurol**, v. 34, p. 618-621, 2002.
14. NOGUEIRA, S. A.; GUEDES, A. L.; MACHADO, E. S.; et al. Toxoplasmic encephalitis in an HIV infected pregnant woman: successful outcome for both mother and child. **Braz J Infect Dis**, v. 6, n. 4, p. 201-205, 2002.
15. CHANG, L.; CORNFORD, M. E.; CHIANG, F. L.; et al. Radiologic-pathologic correlation. Cerebral toxoplasmosis and lymphoma in AIDS. **AJNR**, v. 15, p. 1653-1663, 1995.
16. BORGES, A. S.; FIGUEIREDO, J. F. Detection of anti-Toxoplasma gondii IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome and neurotoxoplasmosis. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 4, p. 1033-1037, 2004.
17. VIDAL, J. E. Toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS. **Prática Hospitalar**, n. 42, 2005. Disponível em <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2042/pgs/materia%2022-42.html>. Acesso em 30/01/2008.
18. LIN, M. H.; CHEN, T. C.; KUO, T. T.; TSENG, C. C.; TSENG, C. P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4121-4125, 2000.
19. LUFT, B. J.; HAFNER, R.; KORZUN, A. H.; et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndromr. **N Engl J Med**, v. 329, p. 995-1000, 1993.
20. SCHOONDERMARK-van de VEN, E.; GALAMA, J.; KRAAIJEVELD, C.; et al. Value of the polymerase chain reaction for detection of toxoplasma gondii in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 16, p. 661-666, 1993.
21. WAINSTEIN, M. V.; WOLFFENBUTTEL, L.; LOPES, D. K.; et al. The sensitivity and specificity of clinical, serological and tomographic diagnosis of toxoplasma gondii encephalitis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 26, n. 2, p. 71-75, 1993.
22. DECKERT-SCHLUTER M. Rudolf Virchow Prize 1998. Award lecture. Toxoplasmosis: a model infection for studying systemic and intracerebral immune reactions. **Verh Dtsch Ges Pathol**. v. 82, n. 9, p. 9-22, 1998.
23. JENKS, J. P. Microbial genome sequencing-beyond the double helix. **BMJ**, v. 317, p. 1568-1571, 1998.
24. KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, 2005.