

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Elias da Rosa Hoffmann

**Histoplasmose em pacientes
portadores de HIV/AIDS em Porto
Alegre, Brasil**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2016**

Elias da Rosa Hoffmann

Histoplasmose em pacientes portadores de HIV/AIDS em Porto Alegre, Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto
Co-orientador: Dr. Diego d'Avila Paskulin

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Hoffmann, Elias da Rosa

Histoplasmose em pacientes portadores de HIV/AIDS em Porto Alegre, Brasil / Elias da Rosa Hoffmann. -- 2016. 91 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2016.

Orientador(a): Alessandro Comarú Pasqualotto ;
coorientador(a): Diego d'Avila Paskulin.

1. Histoplasmose. 2. Imunoensaio. 3. HIV. 4. Infecção disseminada. 5. Micose. I. Título.

Agradecimentos

Agradeço às pessoas que participaram diretamente e indiretamente deste estudo no desenvolvimento e construção do mesmo.

Aos amigos que estiveram presentes, Dra. Sandrine Wagner, Dr. Vlademir Cantarelli, Dra. Tatiane Daboit, Dr. Diego Paskulin, Alexandre Monteiro, Júlia Flores, Tiago Linhares, Eduardo Wandame e aos colegas do mestrado e bolsistas.

Ao orientador Dr. Alessandro C. Pasqualotto, pela paciência e parceria.

Sumário

Agradecimentos.....	II
Lista de abreviaturas.....	IV
Resumo da Dissertação.....	V
1.Introdução.....	1
1.1.Histoplasma capsulatum e histoplasmose disseminada	1
1.2. Epidemiologia da histoplasmose	3
1.3. Diagnóstico e identificação laboratorial de <i>Histoplasma capsulatum</i>	5
1.3.1. Diagnóstico de histoplasmose por métodos clássicos.....	6
1.3.2. Diagnóstico através de testes não baseados em cultivo	7
1.3.3. Métodos sorológicos para identificação de <i>Histoplasma capsulatum</i>	8
1.3.4. Métodos baseados em Imunoensaios enzimáticos para a identificação de <i>H.capsulatum</i>	9
2. Justificativa	22
3. Objetivos.....	23
4.Artigo científico redigido em inglês.....	24
“Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicenter study to evaluate the performance of different diagnostic tests based on urine samples”	24
5.Artigo científico redigido em inglês.....	45
“Disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests”	45
6. Considerações finais.....	63
7.Anexos.....	66
Anexo I: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	67
Anexo II: Ficha clínica	71
Anexo III: Tabela das características clínicas	78

Lista de abreviaturas

AIDS: (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

EIA: *Enzymeimmunoassay*

FC: Fixação do complemento

HC: *Histoplasma capsulatum*

HD: histoplasmose disseminada

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HPA: Antígeno Polissacarídeo de *Histoplasma capsulatum*

ID: Imunodifusão em gel

IMMY: *Immuno-Mycologics, Inc, Norman, Oklahoma, USA*

MVD: *Mira Vista Diagnostics*

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

Resumo da Dissertação

Introdução: A histoplasmose é uma doença oriunda do fungo *Histoplasma capsulatum* podendo assumir caráter disseminado em pacientes imunodeprimidos.

Objetivos: Determinar a frequência de histoplasmose em pacientes com HIV/AIDS e suspeita de infecção disseminada em três hospitais de referência em Porto Alegre/RS, comparando o desempenho de diferentes testes para identificação do antígeno urinário para *H.capsulatum*.

Material e Métodos: Estudo multicêntrico transversal prospectivo. Como critérios de inclusão, os pacientes deveriam apresentar AIDS e pelo menos três dos seguintes sinais: febre, hepatomegalia, esplenomegalia, pancitopenia, padrão miliar, diarreia e perda de peso, além do TCLE e ficha clínica preenchida. As amostras de urina foram processadas no laboratório de Biologia Molecular da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre utilizando três imunoenaios:(1) IMMY® ALPHA ELISA;(2) Teste *in house* desenvolvido pelo CDC de Atlanta;(3) Platelia™ Bio-Rad *Aspergillus* Ag. A análise estatística foi realizada através SPSS 20.0. Revisão sistemática selecionando artigos do período de 1956-2015 no banco de dados PUBMED excluindo artigos como: Revisões, relatos de casos, estudos em modelos não humanos.

Resultados: Ao final foram selecionados 78 pacientes; a positividade para histoplasmose foi 8/78 pacientes (10,3%) através de métodos clássicos. Destes 8 pacientes, 100,0% apresentaram sintomas pulmonares, 62,5% dispneia, 87,5% febre, 50,0% lesões orais e 25,0% padrão miliar. Os testes IMMY®

identificaram 13/78 (16,7%), o CDC 14 (17,9%) e o *Platelia*TM 5 (6,4%) detectado apenas um positivo para histoplasmose.

Conclusão: O estudo demonstrou a frequência de histoplasmose disseminada em pacientes com HIV em Porto Alegre é de 10,3% através dos métodos clássicos. Comparou o desempenho de diferentes métodos, CDC e IMMY® apresentam maior sensibilidade e especificidade. Os sinais clínicos como úlceras orais foram indicadores preditivos de histoplasmose disseminada. Além de mostrar a vantagem da utilização dos testes de imunoenaios para antígeno urinário

Palavras-chave: *Histoplasma capsulatum*, histoplasmose disseminada, imunoenaios.

1.Introdução

1.1.*Histoplasma capsulatum* e histoplasmose disseminada

Histoplasmose é uma micose causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) e sua forma teleomórfica ou sexuada é *Ajellomyces capsulatum* (Goodwin Jr e Des Prez, 1973; Goodwin Jr e Des Prez, 1978; Trabulsi e Alterthum, 2004). *H. capsulatum* é encontrado em sua fase micelial em solos ácidos e úmidos ricos em compostos nitrogenados contendo dejetos de aves de criação, morcegos ou pássaros agregados, podendo permanecer latente no ambiente por um longo período de tempo. O *H. capsulatum* é encontrado na forma filamentosa (hifas) em temperatura ambiente, apresentando a conformação de hifas septadas hialinas e conídios; já a forma leveduriforme, a 37°C, é encontrada aderida aos tecidos do hospedeiro, medindo aproximadamente 3 a 5µm de diâmetro (Cury e cols., 2001; Aidé, 2009; Ferreira e Borges, 2009).

A infecção é adquirida através da inalação de conídios presentes na natureza/solo pela via respiratória, onde o fungo converte-se em fase leveduriforme na temperatura corpórea (Kauffman, 2007). Após a inalação os conídios são fagocitados por macrófagos e polimorfonucleares multiplicando-se e invadem os linfonodos regionais (Guimarães e cols., 2006; Kauffman, 2007). A histoplasmose pode assumir diferentes cursos clínicos, podendo ser assintomática, principalmente em pacientes imunocompetentes. Em outros indivíduos, pode evoluir para infecção pulmonar aguda ou mesmo adotar caráter disseminado, especialmente em pacientes com o sistema imunológico deficiente (Rossini e Goulart, 2006; Aidé, 2009)

H. capsulatum pode ser considerado um dos patógenos oportunistas mais importantes do homem, entretanto, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver a doença, dependendo da quantidade de conídios inalada, desenvolvendo a histoplasmose pulmonar aguda, condição clínica usualmente auto-limitada que pode simular um resfriado comum (Kauffman, 2007; Ferreira e Borges, 2009; Baddley e cols., 2014a).

A histoplasmose disseminada (HD) progressiva é uma doença grave entre os pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), bem como em transplantados em uso de imunossupressores, situação na qual o fungo pode se propagar para diferentes sítios extrapulmonar e extraganglionar, com atividade progressiva (Rossini e Goulart, 2006; Kauffman, 2007). Suas manifestações clínicas são inespecíficas, como febre, sudorese noturna, fadiga, emagrecimento, náusea, vômitos e dispnéia (Wheat e cols., 1990). Tosse, dor torácica e dispnéia ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes (Kaplan, J. E. e cols., 2009). Os pacientes podem desenvolver os sintomas de doença disseminada devido à distribuição do fungo em diversos órgãos e tecidos, dependendo da exposição a grandes quantidades de conídios ou à reativação de nódulos latentes (Goodwin Jr e cols., 1980). O exame físico pode mostrar hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Mandell e cols., 2010). Lesões cutâneas e de mucosas também podem estar presentes, o que depende de singularidades genéticas do fungo. As cepas brasileiras parecem ter maior tropismo muco-cutâneo que as cepas norte-americanas (Goldani e cols., 2009). Casos graves podem se apresentar como sepse, com disfunção múltipla de órgãos (incluindo insuficiência respiratória ou renal) ou meningite concomitante. A mortalidade pode chegar a 50% nos pacientes com

AIDS, mesmo utilizando-se um tratamento adequado. Nos pacientes sem tratamento a mortalidade chega a 100% (Mandell e cols., 2010). Alterações laboratoriais também ocorrem: pancitopenia, por envolvimento da medula óssea, a qual é altamente prevalente. O aumento de transaminases, desidrogenase láctica e ferritina também são comuns (Baddley e cols., 2014a).

As alterações radiográficas aparecem em 50% a 70% dos pacientes com doença disseminada, mas 30% podem apresentar radiografia de tórax normal (Mandell e cols., 2010). Os achados radiológicos mais comuns são infiltrados intersticiais difusos, reticulonodular e padrão miliar; entretanto, em muitas vezes, o primeiro radiograma pode ser normal (Hage e cols., 2008).

Os achados clínicos, laboratoriais e radiológicos iniciais são inespecíficos, assemelhando-se a outras doenças comuns em pacientes com AIDS, como tuberculose e pneumocistose, especialmente por serem doenças que coexistem nas mesmas regiões (Baddley e cols., 2014b). Devido à semelhança clínica com outras infecções oportunistas, torna-se fundamental um diagnóstico correto e precoce, visando instituir tratamento específico para reduzir a elevada mortalidade associada à doença disseminada (Wheat, 1989; Baddley e cols., 2014a).

1.2. Epidemiologia da histoplasmose

Histoplasmose é a mais comum das micoses endêmicas em pacientes com HIV nos Estados Unidos da América (EUA). Noventa e cinco por cento dos pacientes com AIDS e histoplasmose desenvolvem doença disseminada, sendo que 90% destes têm contagens de CD4 abaixo de 200 células/mm³. Nos EUA, a histoplasmose ocorre em 5% das pessoas que residem em cidades

localizadas em áreas endêmicas, sendo que mais de 25% dos casos ocorrem nas cidades de Indianápolis em Indiana (Ferreira e Borges, 2009).

A histoplasmose é distribuída mundialmente, sendo encontrada nas Américas, na África e no Sudeste da Ásia. Em muitas regiões da América Latina, incluindo o Brasil, a histoplasmose é endêmica, sendo especialmente um problema para pacientes com AIDS (Cahn e cols., 2000). A incidência de histoplasmose na América Latina foi baseada em relatos de casos, teses de mestrado e doutorado de centros universitários mostrando estudos com percentuais variando entre 7% no Brasil, 8% na Guatemala e 21% na Venezuela (De Fernandez e cols., 2001).

Em contrapartida com o estudo de Fernandez *et al.*, em 1998 Fava e colaboradores reuniram diversos estudos conduzidos no Brasil que utilizaram histoplasmina na detecção de histoplasmose e paracoccidiodomicose mostrando uma variação de 2,6% a 93,2%, dependendo da região do país (Fava e Fava Netto, 1998). Outro estudo de grande relevância com histoplasmina conduzido na região nordeste do Brasil por Bezerra e colaboradores mostraram 11,8% de testes positivos para o teste intradérmico em pacientes com HIV (Bezerra e cols., 2013).

A HD é considerada uma doença com alta mortalidade em pacientes HIV não tratados, principalmente em locais com recursos e acessos limitados (Baddley e cols., 2014a). Em estudo realizado na cidade de Uberaba (MG) envolvendo HD em pacientes com AIDS, a mortalidade foi de 47,4%, sendo que 31,6% dos pacientes morreram antes do diagnóstico (Mora e cols., 2008). Em 2006, Casotti e colaboradores coletaram dados de pacientes com AIDS em um hospital universitário no Espírito Santo, confirmando 12 casos de HD no

período de junho de 1999 a maio de 2001 (Casotti e cols., 2006). No Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia foram relatados 17 casos de pacientes com HD e AIDS no período de 1985 a 1995. Acredita-se que a real incidência tenha sido subestimada, gerando assim um baixo número de casos neste período (Borges e cols., 1996). Já no sul do Brasil (Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre), Unis e colaboradores descreveram 70 (33,0%) pacientes com AIDS e HD em 212 casos de histoplasmose durante o período de 1977 a 2002. Nesse estudo, manifestações sistêmicas apareceram em 68/70 (97,1%), 43 (61,4%) apresentaram co-infecções (candidose, herpes zoster, pneumocistose, tuberculose, criptococose, dermatofitose, toxoplasmose cerebral, sarcoma de Kaposi, molusco contagioso, criptosporidiose, endocardite estafilocócica, condiloma plano e hepatite B) (Unis e cols., 2004).

O reconhecimento e tratamento tardios da doença favorecem o aumento da mortalidade em países em desenvolvimento (De Francesco Daher e cols., 2006; Baddley e cols., 2014a). A prevalência de histoplasmose no país é subestimada devido à carência de métodos diagnósticos e o descaso da notificação compulsória para órgãos responsáveis (Vicentini-Moreira e cols., 2008).

1.3. Diagnóstico e identificação laboratorial de *Histoplasma capsulatum*

Para o diagnóstico da HD são levados em consideração o histórico clínico, aspectos radiológicos, pesquisa direta do fungo, achados histopatológicos e cultura do material clínico, além da possibilidade de

detecção através da sorologia, auxiliando para o estabelecimento do diagnóstico final (Wheat, 1989; Aidé, 2009).

1.3.1. Diagnóstico de histoplasmose por métodos clássicos

Os métodos diagnósticos clássicos de histoplasmose incluem a identificação direta do fungo em amostras clínicas e o isolamento por cultura (Baddley e cols., 2014a). Na microscopia direta são utilizadas as colorações de Wright, Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa; são métodos rápidos e de baixo custo, mas com sensibilidade baixa (<10%) (Trabulsi e Alterthum, 2004; Baddley e cols., 2014a). Para os métodos histopatológicos em biópsias são utilizadas as colorações de hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) ou Grocott-Gomery (prata metenamina); nelas, é realizada a visualização do fungo fagocitado por polimorfonucleares e macrófagos, sendo que a sensibilidade do método depende da presença de um patologista experiente (Trabulsi e Alterthum, 2004; Kauffman, 2007; Baddley e cols., 2014a). Entretanto, a necessária preparação dos tecidos pode levar a um atraso diagnóstico (Kauffman, 2007; Mandell e cols., 2010).

O diagnóstico definitivo de HD se baseia no isolamento e identificação de *H. capsulatum* em meio de cultivo; no entanto, é frequente que esse seja negativo em pacientes com histoplasmose. O isolamento e identificação de *H. capsulatum* por cultura de amostras respiratórias, de sangue periférico e de medula óssea permanece como “padrão-ouro” para o diagnóstico; no entanto, o diagnóstico por cultura apresenta diversas limitações: (i) o diagnóstico pode levar até seis semanas; (ii) baixa sensibilidade analítica (85%), dependendo da carga fúngica; e (iii) é uma metodologia que pode requerer procedimentos

invasivos (Guimarães e cols., 2006; Ferreira e Borges, 2009; Baddley e cols., 2014a).

As culturas do fungo podem ser feito em ágar Sabouraud dextrose e cicloheximida e ágar infuso de cérebro-coração com cloranfenicol, e incubados a 25°C e 37°C (Trabulsi e Alterthum, 2004). As culturas feitas a 25°C apresentam crescimento lento, evidenciando colônias brancas algodonosas, com hifas septadas com microconídios e macroconídios; já a 37°C assume a forma leveduriforme, de aspecto cremoso e membranoso, com células ovais evidenciando brotamento único (Trabulsi e Alterthum, 2004).

Outro método utilizado para o cultivo de fungos em infecções disseminadas a coleta para hemoculturas passar por um processo de lise, também conhecido como *Isolator* (lise-centrifugação), o qual pode ser realizado a partir de sangue, medula óssea, fígado, lesões de pele, ou qualquer outro local onde se encontra a infecção (Paya e cols., 1987; Kauffman, 2007). No método *Isolator* utilizam-se tubos com anticoagulante, saponinas e fluorocarbono; os tubos são misturados e após centrifugados e, em seguida, o sedimento é incubado em meios sólido a 25°C e 37°C (Bille e cols., 1983; Oliveira e cols., 2007). O sistema *Isolator* tem se mostrado mais sensível do que automação em sistemas de hemocultura para o cultivo de *H. capsulatum* (Paya e cols., 1987; Kauffman, 2007).

1.3.2. Diagnóstico através de testes não baseados em cultivo

A necessidade de um diagnóstico rápido e simples para a identificação do *H. capsulatum* é uma constante busca na comunidade científica, como já mencionado a cultura pode demorar de 2-6 semanas e os recursos podem ser

limitados, assim a identificação além dos métodos clássicos pode ser feita através de antígenos sorológicos ou urinários, descritos abaixo.

1.3.3. Métodos sorológicos para identificação de *Histoplasma capsulatum*

Os métodos de detecção de anticorpos oferecem alternativa rápida dentre as técnicas microbiológicas. Entretanto, essas metodologias ainda se baseiam na Fixação do Complemento (FC) e na Imunodifusão (ID), as quais mostram algumas limitações: (i) reagentes sintetizados e padronizados no próprio laboratório (*in house*), desconhecendo sua real sensibilidade e especificidade; (ii) necessidade de se documentar a ocorrência de soroconversão; e (iii) baixa relevância em locais endêmicos para a doença (Wheat, 2006; Hage e cols., 2008; Aidé, 2009).

O método de FC é mais sensível do que a ID, embora apresente sensibilidade variável: 72,8% na formamcelial e 94,3% na forma de levedura. A especificidade varia entre 70% a 80% e as reações cruzadas podem ocorrer com blastomicose, candidíase e paracoccidioidomicoses (Pine e cols., 1978; Guimarães e cols., 2006; Kauffman, 2007). Os títulos de anticorpos de 1:8 e 1:16 podem ser observados em indivíduos com infecções passadas ou que vivem em regiões endêmicas expressando resultados fracamente positivos. Outro fator que diminui a sensibilidade do teste são amostras hemolisadas ou lipêmicas (Pine e cols., 1978; Soares e cols., 2002; Guimarães e cols., 2006).

O método de ID é amplamente utilizado na prática clínica e é baseado na precipitação dos anticorpos anti-M e anti-H. Este método torna-se mais específico do que a FC e apresenta como vantagens: (i) o fato de se basear em metodologia simples; (ii) possuir um baixo custo; (iii) especificidade entre 70-

100%; e (iv) sensibilidade variável, de 70-100% (Soares e cols., 2002; Guimarães e cols., 2006; Kauffman, 2007; Arango-Bustamante e cols., 2013).

O teste de FC possui uma baixa especificidade, enquanto o teste de IDé frequentemente negativo na fase aguda da doença, devido ao tempo prolongado necessário para produzir quantidades detectáveis de anticorpos. Estes ensaios são pouco úteis em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com AIDS, considerando-se que a produção de anticorpos pode ser limitada nessa população (Hage e cols., 2008; Kaplan, Jonathan E e cols., 2009). Um estudo brasileiro mostrou baixa concordância entre cultura 27/35 (77%) e ID 20/35 (57%) em pacientes com AIDS (Leimann e cols., 2005).

1.3.4. Métodos baseados em Imunoensaios enzimáticos para a identificação de *H.capsulatum*

A detecção do antígeno polissacarídico de *H. capsulatum* (HPA), através do método de imunoensaio enzimático (EIA), é atualmente disponível para a detecção de antígeno a partir de fluidos de pacientes com histoplasmose (Karimi e cols., 2002). O diagnóstico de histoplasmose através da detecção de antígenos foi baseado na experiência de laboratórios de referência para histoplasmose (Laboratório Miravista, MDV) (Wheat e cols., 2002).

A epidemia do HIV continua aumentando em muitos países em desenvolvimento, necessitando de uma melhoria dos testes baseados na detecção de antígenos e anticorpos para histoplasmose, que sejam de fácil execução, de baixo custo e que possam fornecer um diagnóstico rápido, reduzindo, assim, a morbidade e mortalidade associados à doença. Para a

maioria dos centros médicos, o diagnóstico de histoplasmose costuma ser realizado através de estudos histopatológicos ou micológicos realizados em amostras de lesões cutâneas em pacientes imunodeprimidos, no contexto de infecção disseminada. Porém, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) desenvolveu um teste, já validado experimentalmente na Guatemala e testado também na Colômbia (Scheel, C. M. e cols., 2009; Caceres e cols., 2014), que utiliza amostras de urina dos pacientes, utilizando o mesmo princípio do teste comercializado pelo MDV. Este teste identifica antígenos específicos de *H. capsulatum* e é validado por controles internos e uma curva padrão, aumentando a sensibilidade e a especificidade do resultado. Adicionalmente, uma vantagem do teste é a utilização da urina como amostra biológica, que é obtida de forma fácil e não invasiva (Scheel, Christina M e cols., 2009).

Além do teste disponível pelo MDV, atualmente existe o IMMY® ALPHA ELISA para detecção do *H. capsulatum* (Immuno-Mycologics, Inc, Norman, Oklahoma, USA). Este teste é um ensaio imunoenzimático sanduíche que visa detectar de forma qualitativa o antígeno do *H. capsulatum* em amostras de urina. O teste está disponível no mercado internacional; entretanto, ainda não é comercializado no Brasil. Pode ser utilizado em complemento a outras técnicas diagnósticas, tais como cultura, análise histológica e evidências radiológicas para o diagnóstico de histoplasmose (Lemonte e cols., 2007).

Em 1989 Wheat e colaboradores desenvolveram um método rápido e promissor para a detecção do antígeno urinário para HD em amostras de urina e sangue, detectando 90% na urina e 50% no sangue de pacientes com HD

(Wheat e cols., 1989). O teste mostrou-se também útil para o monitoramento terapêutico de pacientes tratados com anfotericina B (Wheat e cols., 1989). Já em 2006 o teste foi aprimorado para segunda geração com o objetivo de eliminar os falso-positivos do método anterior (Wheat e cols., 2006).

Em contra-partida, em 2007, Cloud e colaboradores junto ao Instituto de Patologia Clínica e experimental da Universidade de Utah desenvolvem e validaram o teste IMMY (Cloud e cols., 2007a). Este novo teste mostrou-se uma alternativa ao método implementado pelo laboratório de referência MVD já que o mesmo não comercializa insumos para a realização do teste. O método IMMY utiliza amostras de urina e basea-se na ligação com anticorpos policlonais, em um ensaio imunoenzimático (Cloud e cols., 2007a). Os resultados de sensibilidade na comparação dos testes IMMY e MVD foram de 98% e 92% respectivamente (Cloud e cols., 2007a). Em defesa do laboratório MVD, LeMonte argumentou sensibilidade desconhecida do IMMY, refazendo os testes e demonstrando maior sensibilidade 92% (MVD) contra 84% (IMMY) (LeMonte e cols., 2007).

Como resposta ao artigo de LeMonte 2007, Cloud criticou o teste do MVD, argumentando haver falhas técnicas e clínicas e mostrando, também, haver reações cruzadas com galactomanana nos estudos do MVD (Cloud e cols., 2007b). Em 2013 Theel e colaboradores comparam IMMY (*H. capsulatum* GM ASR EIA) e MVD, mostrando 97,6% de positividade e 99,8% de especificidade em comparação com MVD; no entanto, com sensibilidade de 64,5% (seguindo o ponto de corte sugerido pelo fabricante). Ao final, ressaltou que o MVD capturou pacientes em tratamento que se mostravam negativos

para IMMY, além de reações cruzadas com *Blastomyces dermatitidis* (Theel e cols., 2013).

Um teste diagnóstico muito utilizado na rotina laboratorial, principalmente para micoses invasivas, é o ensaio comercial *Platelia*TM para a detecção de galactomanana, em pacientes sob risco de aspergilose invasiva (Ranque e cols., 2007; Xavier e cols., 2009). Apesar da reação cruzada com *H. capsulatum*, este método tem se mostrado pouco confiável no diagnóstico de HD (Ranque e cols., 2007; Xavier e cols., 2009). Em um estudo conduzido por Ranque *et al.*, demonstrou-se a utilização do teste *Platelia*TM *Aspergillus* como um possível teste para acompanhamento e diagnóstico de HD, tendo o método apresentado positividade de 8/11 pacientes confirmados com histopatologia e/ou culturas, reforçando a reação cruzada entre testes para diferentes fungos (Ranque e cols., 2007).

Diante deste quadro carente de dados e à importância da detecção da HD como novos testes diagnósticos, o presente estudo propõe a comparação dos métodos IMMY[®], CDC e *Platelia*TM para dosagem do antígeno de *H. capsulatum* em amostras de urina. Além disso, este trabalho visa documentar a frequência de histoplasmose em pacientes infectados pelo HIV já com AIDS e sintomatologia de infecção disseminada em três hospitais de referência de Porto Alegre, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Hospital Nossa Senhora da Conceição e Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Em termos de vigilância epidemiológica, este é o primeiro estudo a avaliar a frequência de histoplasmose em pacientes com AIDS, na cidade de Porto Alegre. Uma vez que se conhece melhor a epidemiologia da HD nestes

pacientes, novas metodologias para o diagnóstico precoce poderão ser implementadas e reduzir a morbimortalidade associada a esta doença.

Referências Bibliográficas

Aidé MA. Capítulo 4-Histoplasmose. J Bras Pneumol: Soc Bras Pneumologia. 2009;35:1145-51.

Arango-Bustamante K, Restrepo A, Cano LE, de Bedout C, Tobon AM, Gonzalez A. Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of histoplasmosis in HIV and non-HIV Colombian patients. Am J Trop Med Hyg. 2013;89:937-942.

Baddley JW, Bartlett JG, Mitty J. Diagnosis and treatment of histoplasmosis in HIV-infected patients. 2014.

Baddley JW, Bartlett JG, Mitty J. Epidemiology and clinical manifestations of histoplasmosis in HIV-infected patients. <http://www.uptodate.com> 2015..

Bezerra FS, Zancoppe-Oliveira RM, Brilhante RSN, Wanke B, Mota RMS, Ramos APG, et al. Histoplasmin survey in HIV-positive patients: results from an endemic area in northeastern Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55:261-265.

Bille J, Stockman L, Roberts G, Horstmeier C, Ilstrup D. Evaluation of a lysis-centrifugation system for recovery of yeasts and filamentous fungi from blood. J Clin Microbiol. 1983; 18:469-71.

Borges A, Ferreira M, Silvestre M, Nishioka SA, Rocha A. Histoplasmosis in immunodepressed patients: study of 18 cases seen in Uberlandia, MG. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1996; 30:119-124.

Caceres DH, Scheel CM, Tobón ÁM, Cleveland AA, Restrepo Á, Brandt ME, et al. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Detects *Histoplasma capsulatum* Antigenuria in Colombian Patients with AIDS for Diagnosis and Follow-Up during Therapy. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21:1364-1368.

Cahn P, Belloso WH, Murillo J, Prada-Trujillo G. AIDS in Latin America. *Infect DisClin North Am.* 2000;14:185-209.

Casotti JAS, Motta TQR, Ferreira Júnior CUG, Cerutti Junior C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espírito Santo state, Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). *Braz JInfect Dis.* 2006;10:327-30.

Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER. Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. *Ame JClin Pathol.* 2007;128:18-22.

Cloud JL, Bauman SK, Pelfrey JM, Ashwood ER. Biased report on the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1389-1391.

Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AGC, Hobaika ABS. Outbreak of histoplasmosis in Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001;34:483-6.

de Fernandez MI, Negroni R, Arechavala A. Tibial abscess caused by *histoplasma capsulatum*. *Medicina.* 2001;61:191-192.

de Francesco Daher E, de Sousa Barros FA, da Silva Junior GB, Takeda CF, Mota RM, Ferreira MT, et al. Risk factors for death in acquired immunodeficiency syndrome-associated disseminated histoplasmosis. *Am JTropMedHyg.* 2006;74:600-603.

Fava SDC, Fava Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40:155-164.

Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42:192-198..

Goldani LZ, Aquino VR, Lunardi LW, Cunha VS, Santos RP. Two specific strains of *Histoplasma capsulatum* causing mucocutaneous manifestations of histoplasmosis: preliminary analysis of a frequent manifestation of histoplasmosis in southern Brazil. *Mycopathologia.* 2009;167:181-186.

Goodwin Jr R, Des Prez R. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. *S Med J* 1973; 66: 13-25.

Goodwin Jr RA, Des Prez RM. Histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 929-956.

Goodwin JR RA, Shapiro JL, Thurman GH, Thurman SS, Des Prez RM. Disseminated histoplasmosis: clinical and pathologic correlations. *Medicine*. 1980;59:1-33.

Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Bras J Microbiol*. 2006;37(1):1-13.

Hage CA, Wheat LJ, Loyd J, Allen SD, Blue D, Knox KS. Pulmonary histoplasmosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. New York: Thieme Medical Publishers, 2008: 151-165

Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control*. 2009;58:1-207.

Kaplan JE, Benson C, Holmes KK, Brooks JT, Pau A, Masur H, et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. *MMWR Recomm Rep*. 2009;58:1-207.

Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, et al. Differences in histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States and Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186:1655-1660.

Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *ClinMicrobiol Rev.* 2007;20(1):115-32.

Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Ibero Am Micol.* 2005;22:141-146.

LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:802-803.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Elsevier, 2010.

Mora DJ, dos Santos CT, Silva-Vergara ML. Disseminated histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome patients in Uberaba, MG, Brazil. *Mycoses.* 2008;51:136-140.

Oliveira FdM, Fernandes SS, Severo CB, Guazzelli LS, Severo LC. Histoplasma capsulatum fungemia in patients with acquired immunodeficiency

syndrome: detection by lysis-centrifugation blood-culturing technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49:135-8.

Paya CV, Roberts GD, Cockerill FR, editors. Laboratory methods for the diagnosis of disseminated histoplasmosis: clinical importance of the lysis-centrifugation blood culture technique. *Mayo Clinic proceedings*; 1987: Elsevier.

Pine L, Malcolm GB, Gross H, Gray S. Evaluation of purified H and M antigens of histoplasmin as reagents in the complement fixation test. *Med Mycol*. 1978;16:257-269.

Ranque S, Pelletier R, Michel-Nguyen A, Dromer F. Platelia Aspergillus assay for diagnosis of disseminated histoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol InfectDis*. 2007;26:941-943.

Rossini TF, Goulart LS. Histoplasmoze clássica: revisão. *Rev Bras Anal Clin*. 2006;38(4):275-9.

Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16:852-858.

Soares JLM, Rosa DD, Leite VRS, Pasqualotto AC. Métodos diagnósticos: consulta rápida: *Artmed*; 2002.

Theel ES, Jespersen DJ, Harring J, Mandrekar J, Binnicker MJ. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3555-3559.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. Atheneu, 2004.

Unis G, Oliveira FdM, Severo LC. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. *RevSoc Bras Med Trop*. 2004;37:463-468.

Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RdS, Barreto LC, Freitas RSd, et al. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista (Online)*. 2008;5:8-11.

Wheat L. Diagnosis and management of histoplasmosis. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1989; 8: 480-490.

Wheat L, Connolly P, Durkin M, Book B, Pescovitz M. Elimination of false-positive *Histoplasma* antigenemia caused by human anti-rabbit antibodies in the second-generation *Histoplasma* antigen assay. *Transpl Infect Dis*. 2006;8:219-221.

Wheat LJ. Improvements in diagnosis of histoplasmosis. 2006.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Kohler RB, Frame PT, Gupta MR. *Histoplasma* capsulation polysaccharide antigen detection in diagnosis and

management of disseminated histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am JMed.* 1989;87:396-400.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL, Curfman MF, Eads ME, Israel KS, et al. Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine.* 1990;69:361-374.

Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2002;43:29-37.

Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso ICE, Severo LC. Cross-reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* species in the commercial Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:132-133.

2. Justificativa

A necessidade de aprimorar e desenvolver testes para a detecção de *H.capsulatum* possibilita novas pesquisas, este é o primeiro estudo que compara três específicas metodologias de imunoensaios para a detecção do fungo, além de dados clínicos sobre a infecção mostrando a relevância do diagnóstico. Já em termos de vigilância epidemiológica, reforça a necessidade da investigação do microrganismo no país, principalmente em Porto Alegre (RS).

3. Objetivos

- a) Determinar a frequência de histoplasmosose em pacientes com HIV/AIDS e suspeita de infecção disseminada em Porto Alegre/RS;
- b) Comparar o desempenho de diferentes testes para identificação do antígeno urinário para *H.capsulatum*;
- c) Identificar critérios clínicos que possam predizer HD;
- d) Redigir uma revisão sistemática sobre métodos alternativos ao cultivo do *H. capsulatum*.

4. Artigo científico redigido em inglês

“Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicenter study to evaluate the performance of different diagnostic tests based on urine samples”

Elias R. Hoffmann, Tatiane C. Daboit, Diego D. Paskulin; Alexandre A. Monteiro, Diego R. Falci, Luciano Z. Goldani, Marineide G. de Melo, Paulo R. Behar, Angela A. Cleveland, Christina M. Scheel, Tom Chiller, Mary Brandt, Alessandro C. Pasqualotto

Enviado para publicação na Revista “*Clinical and Vaccine Immunology*”.

1 **Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicenter**
2 **study to evaluate the performance of different diagnostic tests based on**
3 **urine samples**

4

5 E. R. Hoffmann¹, T. C. Daboit^{1,2}, D. D. Paskulin³; A. A. Monteiro^{1,3}, D. R.
6 Falci^{1,4}, L. Z. Goldani⁵, M. G. de Melo⁶, P. R. Behar^{1,3}, A. A. Cleveland⁷, C. M.
7 Scheel⁷, T. Chiller⁷, M. Brandt⁷, A. C. Pasqualotto^{1,3}#

8

9 1) Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil,
10 2) Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Brazil, 3) Irmandade Santa Casa de
11 Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, 4) Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto
12 Alegre, Brazil, 5) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 6) Hospital
13 Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, Brazil, 7) Centers for Disease Control and
14 Prevention, Atlanta, USA.

15

16 Running Head: Diagnostic tests for disseminated histoplasmosis

17

18 #Corresponding author: Alessandro C. Pasqualotto

19 Molecular Biology Laboratory, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto
20 Alegre

21 Av Independência 155, Porto Alegre, 90430-020, Brazil.

22 Tel: +55 51 99951614; fax: +55 51 32137491

23 E-mail: pasqualotto@santacasa.tche.br

24

25 **Abstract**

26 The burden of histoplasmosis has been poorly documented in most of the
27 endemic areas for the disease, including Brazil. Also, modern non-culture-
28 based diagnostic tests are often non-available in these regions. Here we report
29 the results of a prospective cohort study in which HIV-infected patients with
30 suspected disseminated disease were evaluated with different non-invasive
31 diagnostic tests, applied to urine samples. Patients were enrolled in three
32 referral medical centers in Porto Alegre, Southern Brazil. Among 78 evaluated
33 patients (2014-2015), disseminated histoplasmosis was confirmed in 8
34 individuals (10.3%) by the means of classical (culture/histopathology) tests.
35 Antigen detection in the urine was found to be more sensitive: IMMY® ALPHA
36 ELISA detected 13 positive cases (overall prevalence 16.7%) and the in house
37 ELISA test developed by the CDC detected 14 patients (17.9%). IMMY® and
38 CDC tests provided concordant results in 96.2% of cases (75/78).
39 Galactomannan detection in the urine (Platelia™) had a sensitivity of 12.5%.
40 This is the first study to compare the performance of the in house CDC ELISA
41 urinary test with a commercial test for the diagnosis of histoplasmosis, and a
42 high degree of concordance was observed. Also, the study revealed that *H.*
43 *capsulatum* is an important agent of disseminated disease in AIDS patients in
44 Southern Brazil, reinforcing the importance of making available both diagnostic
45 tests and antifungal agents for the treatment of such severe diseases.

46

47 **Introduction**

48 Histoplasmosis is a group of diseases caused by the thermally dimorphic
49 fungus *Histoplasma capsulatum* (1, 2). Infection is primarily acquired via
50 inhalation of fungal spores present in nature, which is followed by conversion to
51 the yeast (pathogenic) fungal form at human body temperature. Infection may
52 range from asymptomatic presentation to disseminated disease, the latter
53 affecting mostly immunocompromised individuals, particularly those infected
54 with the human immunodeficiency infection virus (HIV)(3).

55 Disseminated histoplasmosis is a serious disease among patients with acquired
56 immunodeficiency syndrome (AIDS). Its clinical symptoms are nonspecific, such
57 as fever, night sweats, fatigue, weight loss, nausea, vomiting and dyspnea (4).

58 Physical examination may reveal hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, and
59 skin and oral lesions (5, 6). Most (~50-70%) patients with disseminated disease
60 have radiographic abnormalities, including diffuse lung infiltrates,
61 reticulonodular and milliary patterns(6, 7). Definitive diagnosis is based on
62 histopathology and/or the isolation of *H. capsulatum* in culture of clinical
63 specimens, particularly respiratory, peripheral blood and bone marrow samples.
64 However, diagnosis by culture is limited by several aspects: (i) results may take
65 up to six weeks to turn positive; (ii) sensitivity is usually low (<60-85%,
66 depending on the fungal load); and (iii) an invasive medical procedure is
67 frequently required to obtain samples (5, 8-10).

68 More recently, non-culture-based tests have been developed to facilitate
69 diagnosis of disseminated histoplasmosis. In particular, *H. capsulatum*
70 polysaccharide antigens (HPA) have been detected by enzyme immunoassay
71 (EIA) methods, allowing for a rapid and non-invasive diagnosis (tests are

72 performed in urine samples) (11). Until recently, there was only one
73 *Histoplasma* antigen detection test in the market, commercialized by Mira Vista
74 Laboratory (MVD, Indiana, USA). Although being widely studied, the MVD test
75 is not sold outside the US (samples have to be shipped to North America),
76 being a important limitation to its use. In recent years, Immuno-Mycologics
77 (Oklahoma, USA) launched IMMY® ALPHA ELISA, a test also based on *H.*
78 *capsulatum* antigen detection by EIA (12). Studies comparing these two EIA
79 tests are very limited in the literature (12-14). Lately, the US Centers for
80 Disease Control and Prevention (CDC) developed a *Histoplasma* EIA urinary
81 test (15). So far, the IMMY® and CDC tests have not been directly compared in
82 a prospective clinical study, which motivated us to conduct the current
83 investigation.

84 **Materials and Methods**

85 This was a multicenter prospective study comparing diagnostic tests for *H.*
86 *capsulatum* infection in three referral tertiary care centers in Porto Alegre,
87 Brazil. Similar to several other regions of Brazil, Porto Alegre is an endemic
88 area for histoplasmosis (16, 17). Also, Porto Alegre has the largest incidence of
89 HIV-infection among Brazilian capitals (18). We included in the study HIV-
90 infected patients between the years 2014-2015 with suspected disseminated
91 histoplasmosis in any of the participant hospitals. Only in-patients were studied.
92 Disseminated histoplasmosis was considered in the presence of at least 3 of
93 the following: fever, weight loss, diarrhea, hepatomegaly and/or splenomegaly,
94 pancytopenia or milliary pattern on chest imaging (15). The study included only
95 adults (>18 years-old) who gave written consent to study entrance. Ethical
96 approval was obtained in all centers.

97 For all participant patients, a void urine sample was obtained at time of
98 enrollment (~20 ml). Samples were refrigerated on ice for a maximum period of
99 24 hours and transported to a central laboratory (Molecular Biology Laboratory
100 at Santa Casa de Porto Alegre) where all analyses were performed. When
101 arrived at the Laboratory samples were frozen (-80°C) for further analysis.
102 Laboratory technicians remained blinded for the results of other diagnostic tests
103 for disseminated histoplasmosis, as well as for clinical information. Follow-up
104 urine testing was not performed.

105 The tests used in the study were two specific methods for detection of urinary
106 *Histoplasma* antigens: a commercial test, IMMY® ALPHA ELISA (Immuno-
107 Mycologics, Oklahoma, USA), and an in house ELISA method developed by the
108 United States of America (US) CDC.

109 The IMMY® test is a type sandwiche enzyme-linked immunosorbent assay for
110 *Histoplasma* antigens detection in urine. The method uses anti-*Histoplasma* IgG
111 polyclonal antibodies derived from rabbits adhered in a microplate, in addition to
112 a standard curve with 100, 30, 10 and 2 EIA units. Results are expressed
113 qualitatively and every reaction includes positive and negative controls (13).
114 Samples were processed according to the manufacturer's instructions. For the
115 interpretation of IMMY® results, we used the same cut-off proposed by the
116 manufacturer, i.e., an increment in ≥ 2 EIA units. All positive results were
117 retested to confirm test positivity. Execution time for the IMMY assay is ~ 4
118 hours.

119 The CDC tests an enzyme-linked immunosorbent assay that was previously
120 standardized and validated by Scheel and contributors in a study conducted in
121 Guatemala (15).The samples and standards were processed as described in

122 the original publication, as follows: (i) microplate was sensitized with the
123 antibody coating antibody (anti-killed whole *Histoplasma* PAb); (ii) samples
124 were boiled at 100 °C; (iii) the standard curve was prepared with seven points –
125 samples were incubated on shaker at room temperature for 1 h; (iv) conjugate
126 buffer (horseradish peroxidase-conjugated PAb) was prepared in 4% milk
127 solution in PBS; (v) plate was washed and dried; (vi) conjugate buffer was
128 dispensed and incubation was made on shaker at room temperature for 30 min;
129 (vii) plate was washed and dried; (viii) substrate TMB (Sigma-Aldrich®) was
130 added and left for 15 min without shaking at room temperature; (ix) reaction was
131 stopped with H₂SO₄1M; (x) plate was read at 450 nm using the
132 spectrophotometer (Bio-Rad ELISA reader); (xi) results were analyzed in
133 comparison to the standard curve and the execution of the test takes ~6-8 hours
134 until results are available. The cut-off for test positivity was the same as
135 published in the original study, in which a sensitivity of 81% and a specificity of
136 95% were documented (15).

137 In addition to testing for *Histoplasma* antigen in urine samples, patients were
138 also tested for the presence of galactomannan (GM) in the urine. This was
139 performed with a commercial ELISA kit (Platelia™ *Aspergillus* EIA, Bio-Rad,
140 France). Urine samples were treated following the manufacturer's instructions
141 for serum with execution times of ~4 hours.

142 Non-culture based diagnostic tests for disseminated histoplasmosis were
143 compared with classical methods such as fungal culture and histopathology.
144 Since this was an observational study not every patient was submitted to such
145 diagnostic procedures. For the purpose of this study, diagnosis of disseminated
146 histoplasmosis was considered as proven by the means of classical methods

147 only (hereafter referred to as 'gold-standard', against which the performance of
148 all other diagnostic tests was compared). Clinical and demographic data were
149 obtained for all patients including clinical presentation of disease, laboratory and
150 imaging results. Descriptive statistics was used to summarize the data.
151 Quantitative variables were compared using Student's *t* test or Mann-Whitney *U*
152 test, according to data distribution. Categorical data were treated with Fisher's
153 exact test or Chi-square test, as appropriate. All analysis were performed using
154 SPSS 20.0 taking into account a P value <0.05 as statistically significant.
155 Variables associated with p values <0.20 were considered for inclusion in the
156 multivariate analysis, performed with Enter selection. This study was approved
157 by the hospital's ethics committee Irmandade da Santa Casa de Misericordia de
158 Porto Alegre (01371812.9.1001.5335/2014).

159 **Results**

160 A total of 78 patients were screened for study participation and they were all
161 included in the study. Patients were all from Porto Alegre and nearby cities. The
162 mean age was 44.2 (± 10.3) years, with 65.4% male sex. A total of 46.2%
163 patients were on HAART. The most common manifestations were: 79.5% fever,
164 80.8% weight loss, 78.2% pulmonary symptoms, 76.9% abdominal
165 manifestations, 51.3% enlarged lymph nodes, 44.2% skin lesions and 41.7%
166 neurological symptoms. Median time between beginning of symptoms and
167 inclusion in the study was 2.7 months.

168 Eight out of 78 patients were diagnosed with disseminated histoplasmosis
169 (10.2%), according to the gold-standard. Most of these patients were diagnosed
170 by histopathology, including lung biopsy (n=3), skin biopsy (n=1), nasal lesion
171 (n=1), oral ulcer (n=1) and biopsy of the duodenum (n=1), while 3 additional

172 patients were culture-positive (nasal lesion, oral ulcer and blood culture). For
173 these eight patients with disseminated histoplasmosis, median CD4 and HIV
174 viral load were 26 cells/mm³ (range, 1-1,453/mm³) and 360,104 copies/ml
175 (range, <25 to >10,000,000 copies/ml), respectively. All 8 patients with
176 disseminated histoplasmosis had pulmonary symptoms, 62.5% dyspnea, 87.5%
177 fever, diarrhea 50.0%, 50.0% oral lesions, 37.5% skin lesions and 37.5%
178 generalized lymphadenopathy. Regarding radiological aspects, 25.0% revealed
179 a millitary pattern, 25.0% had diffuse infiltrates and 50.0% mediastinal
180 lymphadenopathy.

181 The IMMY® test detected 62.5% more potential cases of disseminated
182 histoplasmosis, in comparison to conventional methods (13/78, overall
183 prevalence 16.7%). Considering these 13 patients as truly having disseminated
184 histoplasmosis, their main clinical findings were skin papules (46.2%), oral
185 ulcers (38.5%), ulcerated skin lesions (38.5%). Mediastinal lymphadenopathy
186 occurred in 38.5% of these patients. In comparison to the gold-standard, the
187 IMMY® test had a sensitivity of 100% and a specificity of 92.9%.

188 The CDC test identified 14 patients with disseminated histoplasmosis
189 (prevalence 17.9%). This group had oral ulcers (35.7%), papules (35.7%),
190 millitary pattern on chest imaging (28.4%) and infiltrates involving the middle
191 lobe (35.7%). In comparison to the gold-standard, the CDC test had a sensitivity
192 of 100%, specificity 91.4%.

193 GM in the urine was detected for only 5 patients (6.4%), but only one of these
194 patients were found to have disseminated histoplasmosis (test sensitivity 12.5%
195 in comparison to gold-standard, specificity 57.1%). Median GM optical indices
196 for the positive cases were 1.33 (range, 0.6-5.55). **Figure 1** compares the

197 positivity rate for the different diagnostic tests evaluated in this study. If the CDC
198 test was taken as the gold-standard, the combination of culture/histopathology
199 had a limited sensitivity (57.1%), and 100% specificity. If IMMY® was
200 considered the diagnostic method of choice test sensitivity for
201 culture/histopathology was of 86.7%, while specificity was 98.8%.

202 Overall 30-days mortality for the 78 patients screened during the study time was
203 15.4% (12/78). On the other hand 25.0% (2/8) of disseminated histoplasmosis
204 patients diagnosed by the means of culture/histopathology died during the 30
205 days of follow up. Antifungal therapy was given to all patients with
206 histoplasmosis, including deoxycholate amphotericin B (6/8 patients), liposomal
207 amphotericin B (4/8), and itraconazole (5/8).

208 Additional diagnoses performed during the study period were tuberculosis
209 (13/78; 16.7%), cryptococcosis (5/78; 6.4%), and bacteremia (3/78; 3.8%).

210 Among patients diagnosed with disseminated histoplasmosis by the means of
211 classical methods, only one (12.5%) had concomitant disseminated
212 tuberculosis. One additional patient also had positive IMMY®/CDC tests and
213 disseminated tuberculosis in the study.

214 **Discussion**

215 This is the first prospective study to document the prevalence of histoplasmosis
216 in a cohort of HIV patients with suspected disseminated disease in Brazil. Even
217 though Brazil is a continental country with more than 200 million inhabitants,
218 and despite the endemic presence of *H. capsulatum* in the Brazilian territory,
219 the burden of such an important disease has remained poorly investigated.
220 Also, this is the first study in Brazil to use modern diagnostic tests like
221 *Histoplasma* antigen detection in the urine, and GM. Results of this study

222 showed that both IMMY® and CDC tests performed better than classical
223 diagnostic methods in AIDS patients with suspected disseminated
224 histoplasmosis. As mentioned before, the CDC *Histoplasma* EIA test had not
225 yet been compared with commercial tests such as the IMMY® EIA test. Our
226 results showed that the both IMMY® test and CDC tests detected all cases of
227 disseminated histoplasmosis diagnosed by classic methods, and IMMY®
228 detected 62.5% additional cases of disseminated histoplasmosis, in comparison
229 to culture/histopathology. It is important to mention that CDC will no longer
230 support their EIA antigen test so emphasis here is given on the performance of
231 the commercially-available IMMY® EIA test.

232 Previous studies have already demonstrated that the Platelia™ *Aspergillus* GM
233 test may cross-react with *H. capsulatum*(19-21), suggesting a potential use of
234 this test in patients with histoplasmosis. To the best of our knowledge, this was
235 the first test to prospectively evaluate the performance for GM testing in urine
236 samples of patients with suspected histoplasmosis. Our results showed clearly
237 that such approach was associated with an unacceptably low sensitivity
238 (12.5%). The impact of concentrating urine samples before GM testing remains
239 to be elucidated.

240 We were also interested in validating clinical predictors of histoplasmosis in
241 AIDS patients with suspected disease, using classical methods as a reference
242 but also the novel urine ELISA tests. Interestingly, the presence of oral ulcers
243 strongly favored the diagnosis of disseminated histoplasmosis, regardless of the
244 chosen gold-standard (classical methods, IMMY® or CDC). Other variables of
245 importance were pulmonary symptoms, mediastinal lymphadenopathies, and
246 skin lesions (papules). These findings are in accordance to the literature (22,

247 23). Disseminated tuberculosis is always an important differential diagnosis
248 (diagnosed in 13 patients in our cohort), and this should be systematically
249 investigated since co-existence of *H. capsulatum* and *M. tuberculosis* infection
250 may occur (8). Even though skin involvement is frequent in disseminated
251 histoplasmosis and should facilitate diagnosis, cutaneous involvement seems to
252 be far more frequent in Latin America, in comparison to North America cases
253 (22). Therefore, generalization of our results should be performed cautiously.
254 Since we did not test patients at early stages of diseases, we can also
255 extrapolate our findings for patients with suspected disseminated disease only.
256 Also, the current study was not designed to evaluate the performance of tests
257 for disease follow-up after treatment; instead, tests were studied for the
258 diagnostic purpose only.

259 A diagnostic meta-analysis on the performance of *Histoplasma* antigens has
260 been recently published (24). The study revealed a high specificity (98%) and
261 sensitivity (81%) for antigen detection in both urine and serum, reinforcing the
262 importance of such tests in the early diagnosis of histoplasmosis.

263 The study has some additional limitation that deserves mention. Despite all
264 efforts, we ended up with a limited number of patients recruited in the study, so
265 multivariate analyses could not be performed. This was actually a pilot study
266 and a larger cohort study is currently being initiated, to include 8 additional
267 medical centers in Brazil aiming to better reflect the burden of histoplasmosis in
268 the country. Moreover, GM testing has never been validated for use in urine
269 samples of patients of disseminated histoplasmosis. Since urine samples were
270 stored to be analyzed in batches we were also not able to evaluate time to
271 positivity for the different tests evaluated in this study.

272 **Conclusion**

273 This prospective cohort study confirmed the clinical suspicion that
274 histoplasmosis is an important diagnosis in AIDS patients with suspected
275 disseminated disease. The prevalence of disease varied according to the gold-
276 standard used for diagnosis, from 10.2% (based on culture/histopathology) to
277 16.7% IMMY test and 17.9% (CDC test). The detection of *Histoplasma* antigens
278 in the urine by EIA methods improved diagnostic sensitivity by >40%, in
279 comparison to classical diagnostic methods. Larger multicenter studies
280 involving a large variety of geographic regions are ultimately required in Latin
281 America, to better document the burden of disseminated histoplasmosis. For
282 that purpose, modern diagnostic tests and drugs are required in these places.

283

284 **Funding information**

285 “The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or
286 the decision to submit the work for publication.”

287

288 **Acknowledgements**

289 We are grateful to all those who were involved in recruiting patients for the
290 study, particularly Julia M. Flores and Tiago Linhares. Dr Pasqualotto has
291 received research grants and speaker honoraria from Gilead, United Medical,
292 and Bagó. The findings and conclusions in this article are those of the authors
293 and do not necessarily represent the views of the CDC. The use of product
294 names in this manuscript does not imply their endorsement by the US
295 Department of Health and Human Services. This research has been partially
296 presented in the oral session at the XIX Brazilian Conference of Infectious
297 Diseases, Gramado, Brazil, 2015.

298

299 **Appendixes**

300 A (**Table 1**)

301 B (**Figure 1**)

302

303 **References**

- 304 1. **Goodwin Jr R, Des Prez R.** 1973. Pathogenesis and clinical spectrum of
305 histoplasmosis. S Med J **66**:13-25.
- 306 2. **Goodwin Jr RA, Des Prez RM.** 1978. Histoplasmosis. Am Rev Respir
307 Dis **117**:929-956.
- 308 3. **Kauffman CA.** 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update.
309 Clin Microbiol Rev **20**:115-132.
- 310 4. **Wheat LJ, Connolly-Stringfield PA, Baker RL, Curfman MF, Eads**
311 **ME, Israel KS, Norris SA. Webb DH, Zeckel ML.** 1990. Disseminated
312 histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical
313 findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. Medicine
314 **69**:361-374.
- 315 5. **Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM.** 2006.
316 Diagnosis of histoplasmosis. Braz J of Microbiology **37**:1-13.
- 317 6. **Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ.** 2014. Mandell, Douglas, and Bennett's
318 principles and practice of infectious diseases. Elsevier Health Sciences.
- 319 7. **Hage CA, Wheat LJ, Loyd J, Allen SD, Blue D, Knox KS.** Pulmonary
320 histoplasmosis, p 151-165. In: Seminars in respiratory and critical care
321 medicine. New York: Thieme Medical Publishers, 2008.
- 322 8. **Baddley JW, Bartlett JG, Mitty J.** 2014. Diagnosis and treatment of
323 histoplasmosis in HIV-infected patients, <http://www.uptodate.com> 2015.
- 324 9. **Soares JLM, Rosa DD, Leite VRS, Pasqualotto AC.** 2002. Diagnostico
325 da infecção por *Histoplasma capsulatum*, p 358-360. Métodos
326 diagnósticos: consulta rápida, 1 ed. Artmed, Porto Alegre, BR.

- 327 10. **Wheat L.** 1989. Diagnosis and management of histoplasmosis. Eur J
328 Clin Microb Infect Dis **8**:480-490.
- 329 11. **Karimi K, Wheat LJ, Connolly P, Cloud G, Hajjeh R, Wheat E, Alves**
330 **K, da Silva Lacaz C, Keath E.** 2002. Differences in histoplasmosis in
331 patients with acquired immunodeficiency syndrome in the United States
332 and Brazil. J Infect Dis **186**:1655-1660.
- 333 12. **Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER.** 2007.
334 Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the
335 quantitation of Histoplasma antigen in human urine samples. Am J Clin
336 Pathol **128**:18-22.
- 337 13. **LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ.** 2007.
338 Evaluation of the IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme
339 immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria.
340 Clin Vaccine Immunol **14**:802-803.
- 341 14. **Cloud JL, Bauman SK, Pelfrey JM, Ashwood ER.** 2007. Biased report
342 on the IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme immunoassay for
343 diagnosis of histoplasmosis. Clin Vaccine Immunol **14**:1389-1391.
- 344 15. **Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed**
345 **Y, Hart J, Lima S, Rivera BE, Raxcaco G.** 2009. Development and
346 evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect
347 Histoplasma capsulatum antigenuria in immunocompromised patients.
348 Clin Vaccine Immunol **16**:852-858.
- 349 16. **Severo LC, Unis G, Oliveira FdM.** 2004. Histoplasmosse disseminada
350 no Rio Grande do Sul. Rev Soc Bra Med Trop **6**:463-468.

- 351 17. **Unis G, Roesch EW, Severo LC.** 2004. Histoplasmosse pulmonar aguda
352 no Rio Grande do Sul. J Bras Pneumol **31**:52-59.
- 353 18. **Saude Md.** 2015. Ministerio da Saude Frequencia de diagnostico de
354 HIV Rio Grande do Sul, on 2015. <http://portalsaude.saude.gov.br/>.
355 Accessed 26/11/2015.
- 356 19. **Cummings JR, Jamison GR, Boudreaux JW, Howles MJ, Walsh TJ,**
357 **Hayden RT.** 2007. Cross-reactivity of non-Aspergillus fungal species in
358 the Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay. Diagn Microbiol
359 Infect Dis **59**:113-115.
- 360 20. **Ranque S, Pelletier R, Michel-Nguyen A, Dromer F.** 2007. Platelia
361 Aspergillus assay for diagnosis of disseminated histoplasmosis. Eur J
362 Clin Microbiol Infect Dis **26**:941-943.
- 363 21. **Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso ICE, Severo LC.** 2009. Cross-
364 reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and
365 *Cryptococcus* species in the commercial Platelia Aspergillus enzyme
366 immunoassay. Clin Vaccine Immunol **16**:132-133.
- 367 22. **Goldani LZ, Aquino VR, Lunardi LW, Cunha VS, Santos RP.** 2009.
368 Two specific strains of *Histoplasma capsulatum* causing mucocutaneous
369 manifestations of histoplasmosis: preliminary analysis of a frequent
370 manifestation of histoplasmosis in southern Brazil. Mycopathologia
371 **167**:181-186.
- 372 23. **Vidyanath S, Shameena P, Sudha S, Nair RG.** 2013. Disseminated
373 histoplasmosis with oral and cutaneous manifestations. J Oral Maxillofac
374 Pathol: JOMFP **17**:139-142

- 375 24. **Fandiño-Devia E, Rodríguez-Echeverri C, Cardona-Arias J, Gonzalez**
376 **A.** 2015. Antigen Detection in the Diagnosis of Histoplasmosis: A Meta-
377 analysis of Diagnostic Performance. *Mycopathologia*:1-9.

Anexo para revista

Supplemental material

“Disseminated histoplasmosis and AIDS: a prospective and multicenter study to evaluate the performance of different diagnostic tests based on urine samples”

Tables

Table 1

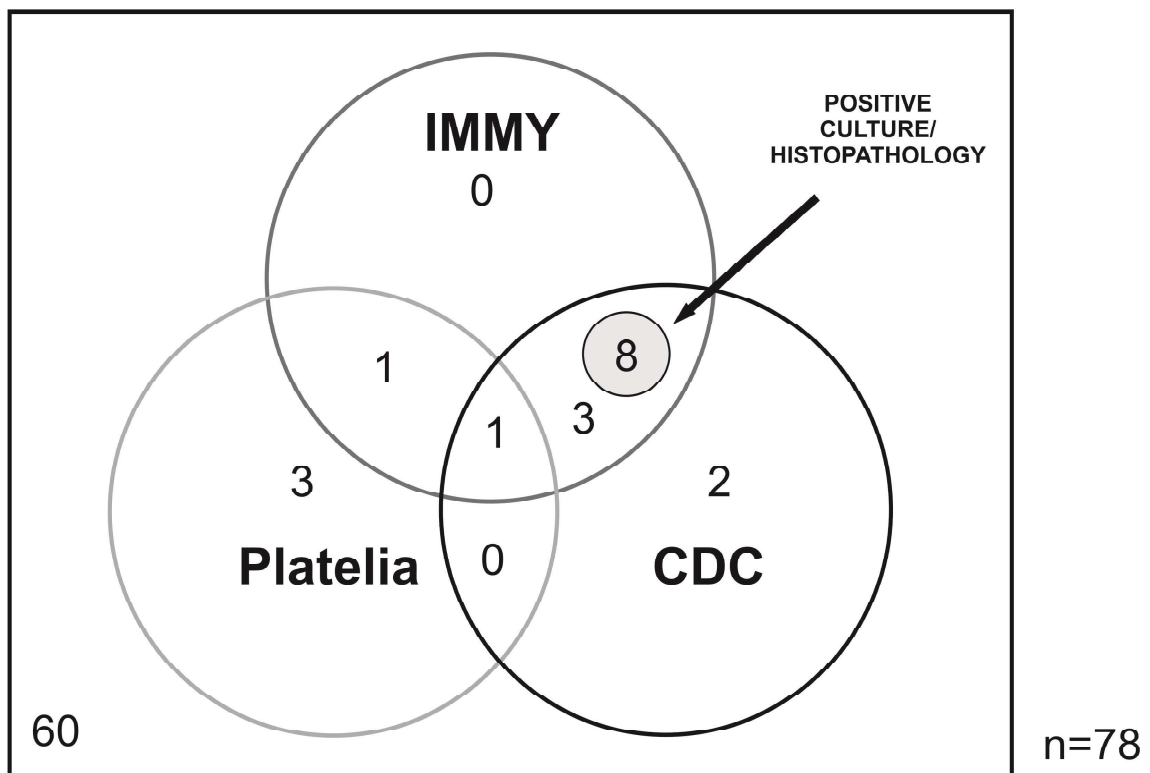
Clinical findings	Gold-standard against which variable was compared							
	CDC		IMMY®		Classic methods		Platelia® GM	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
Oral ulcers	8.3 (1.9-36.9)	0.002	9.5 (2.1-43.0)	0.001	13.0 (2.5-68.2)	<0.001	1.4 (1.0-1.2)	1.000
Pulmonary symptoms	1.8 (0.4-9.1)	0.050	3.9 (0.5-32.5)	0.227	1.32 (1.2-1.5)	0.189	1.3 (1.1-1.5)	0.580
Papules	3.9 (1.0-14.6)	0.035	7.0 (1.9-27.2)	0.002	1.8 (0.3-10.0)	0.614	1.3 (0.1-12.4)	1.000
Mediastinal lymphadenopathy	3.4 (0.9-12.5)	0.056	3.9 (1.0-14.6)	0.035	6.0 (1.3-28.0)	0.013	1.1 (0.1-11.2)	1.000

Legend: CI, Confidence Interval; GM, Galactomannan; OR, Odds Ratio.

Clinical predictors for histoplasmosis, according to different gold-standards: CDC, IMMY®, Classic methods (culture/histopathology), or Platelia®galactomannan.

Figures

Figure1



Performance of IMMY®, CDC, Platelia™ and classical methods in the identification of disseminated histoplasmosis. The numbers within the circles correspond to positive results respectively. A total of 78 patients were included, and 60 patients were negative for all tests evaluated in the study.

5. Artigo científico redigido em inglês

“Disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests”

Elias da R. Hoffmann¹, Diego D. Paskulin², Alessandro C. Pasqualotto^{1,2*}

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

² Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Enviado para publicação na Revista “*Brazilian Journal of Infectious Diseases*”.

1 **Disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of**
2 **non-culture-based diagnostic tests**

3 E. R. Hoffmann¹, D. D. Paskulin², A. C. Pasqualotto^{1,2}

4 *1) Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre*

5 *2) Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre*

6 Correspondence to: Alessandro C. Pasqualotto Molecular Biology Laboratory,
7 Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Av Independencia 155, Centro,
8 Porto Alegre, 90430-020, RS, Brazil. Fax: +55 51 32137491; Phone: +55 51
9 99951614. E-mail: pasqualotto@santacasa.tche.br.

10

11 **Abstract**

12 Disseminated histoplasmosis diagnosis is often a challenge to the clinician,
13 especially due to the low sensitivity and turnaround time of the classical
14 diagnostic methods. In recent years, studies involving a variety of non-culture-
15 based diagnostic tests have been published in the literature. The aim of this
16 paper is to perform a systematic review by selecting articles involving non-
17 culture-based diagnostic methods in the diagnosis of disseminated
18 histoplasmosis. These search included serological, immunological, antigens and
19 PCR methods. A comprehensive Pubmed search between 1956 and 2015 was
20 performed. Case reports, review articles, non-human models and series
21 involving less than 10 patients were excluded. We selected 206 articles
22 including serological methods, immunoassays and detection by molecular
23 techniques and after the pipeline of selection, only 18 of these were utilized:
24 (13) immunoassays, (4) and molecular methods (1) serological methods. In
25 conclusion, the pursuit of new technologies in association with clinical criteria is
26 still mandatory for the diagnosis of disseminated histoplasmosis. However the
27 performance tests for urinary antigen detection was shown to be an alternative
28 in comparison with other techniques due to its faster procedures in identifying
29 potential patients with HD.

30 **Key words:** Disseminated histoplasmosis; non-culture; enzyme immunoassay;
31 diagnostic tests.

32

33 **Introduction**

34 Histoplasmosis is a serious fungal disease caused by the thermally dimorphic
35 fungus *Histoplasma capsulatum* [1]. Humans develop histoplasmosis by
36 inhaling *H. capsulatum* spores from the environment, usually in the context of
37 acid and moist nitrogen-rich soils containing excrement from poultry, bats or
38 birds. Even though histoplasmosis may be a self-limiting disease, disseminated
39 infection may occur particularly in the immunocompromised host. Diagnosis of
40 disseminated histoplasmosis (DH) has historically been made by a combination
41 of fungal culture and histopathology. However, these may require invasive
42 medical procedure to obtain tissues and culture may take up to 6 weeks to
43 reveal fungal growth [2]. Moreover, in recent years a variety of non-culture-
44 based diagnostic methods has been developed to diagnose DH, aiming for an
45 early and more sensitive diagnosis [3]. In this study we performed a systematic
46 review of the available data on these novel technologies, summarizing their
47 performance.

48 **Methods**

49 A computerized Pubmed search without language restrictions was conducted
50 for articles published up to December 2015 combining the following terms
51 ((DISSEMINATED HISTOPLASMOSIS) AND (ANTIBODY OR MOLECULAR
52 OR "POLYMERASE CHAIN REACTION"[MH] OR ANTIGEN OR
53 IMMUNODIFFUSION OR "COMPLEMENT FIXATION
54 TESTS/METHODS"[MAJR] OR "LATEX FIXATION TESTS"[MH]) AND
55 (DIAGNOSIS)). Only original articles dealing with non-culture-based diagnostic
56 tests for DH were studied. References from selected articles were also
57 screened for review. Publications describing case reports, review articles, case

58 series involving <10 patients, and histoplasmosis in non-humans were not
59 included in the review (Figure 1).

60 This systematic review aims to briefly describe the performance of non-culture-
61 based diagnostic methods for the identification of *Histoplasma capsulatum*,
62 focusing on three distinct test groups: (i) Serological tests, including
63 immunodiffusion, complement fixation and latex agglutination; (ii) Immunological
64 tests, as the enzyme immunoassays (EIAs); and (iii) Molecular methods.

65 **Results**

66 ***Serological tests: immunodiffusion, complement fixation and latex*** 67 ***agglutination test***

68 Currently, two main serological tests are used for the detection of *H.*
69 *capsulatum* antibodies: immunodiffusion and complement fixation [3]. Although
70 these methods have the advantage of being non-invasive, but enclose several
71 limitations, including (i) marked intra-patients variation in results; (ii) long time
72 for positive results (up to six weeks are required after exposure for antibody
73 production); (iii) potential cross-reactivity with antibodies produced by other
74 fungi such as *Blastomyces dermatitidis* [4-6].

75 The immunodiffusion method is widely used in clinical practice and it is based
76 on the precipitation of the anti-M and anti-H antibodies. This method is more
77 specific than the complement fixation [7, 8] and presents the following
78 strengths: (i) it is based on simple and reliable methodology; (ii) it has a low
79 cost; (iii) specificity is close to 70-100% [7, 9].

80 The complement fixation method is more sensitive than the immunodiffusion
81 test and presents variable test sensitivity, depending on the antigen phase,

82 ranging from 72.8% in mycelial to 94.3% in yeast phase. The specificity varies
83 between 70% to 80%, since cross-reactions may occur with blastomycosis,
84 candidiasis and paracoccidioidomycoses. Antibody titers of 1:8 and 1:16 are
85 frequently seen in individuals with past infections or living in endemic regions
86 and these are considered weakly positive results. Test sensitivity is reduced in
87 the presence of hemolytic and lipaemic samples [7, 8, 10].

88 *H. capsulatum* may also be detected by the means of latex agglutination test.
89 The test is based on latex connection with histoplasmin for the detection of the
90 antibody anti-*Histoplasma*. Studies conducted in mid to late 1970s
91 demonstrated that the latex test was not suited for the correct identification of *H.*
92 *capsulatum* because of the cross-reactivity with tuberculosis and also due to its
93 low sensitivity (64%) and specificity (39%), in comparison with the gel
94 immunodiffusion [11]. Shipe and collaborators showed that latex sensitivity was
95 9.2% as compared to 4.1% for complement fixation in an endemic area for
96 histoplasmosis. Main test advantages are low cost and better specificity, as
97 compared to the complement fixation test [11, 12].

98 ***Immunological tests: enzyme immunoassays (EIAs)***

99 EIAs are based on the detection of the *H. capsulatum* polysaccharide antigen
100 (HPA) on various biological materials such as urine, serum and *bronchoalveolar*
101 *washing* fluid. Different EIA have been used for the detection of DH, supported
102 by experience reference laboratories for the diagnosis of histoplasmosis [13-
103 16]. Two commercial EIA tests to detect *H. capsulatum* are currently available in
104 the USA: *MiraVista* in Indianapolis, IN, and *IMMY* in Norman, OK. Both
105 laboratories provide similar and robust EIA tests with minor differences in terms
106 of test performance. However, there has been a strong dispute in the literature

107 on the interpretation of their studies, which seems to be influenced by a
108 marked conflict of interest presented on both sides [15, 17-19].

109 The MVista® *Histoplasma* antigen test is based on a quantitative sandwich
110 enzyme immunoassay designed for serum, plasma, urine, bronchoalveolar
111 lavage fluid and other body fluid testing [16]. The manufacturer recommends
112 the test not to be employed as the exclusive diagnostic tool in patients with
113 histoplasmosis, since cross-reactions may occur with blastomycosis,
114 paracoccidioidomycosis, penicilliosis, sporotrichosis, coccidioidomycosis (less
115 frequently), and aspergillosis (rarely) [16]. Although the MVista® *Histoplasma*
116 antigen test has been largely studied in HIV-infected patients, the test is not
117 executed outside the USA and it is only performed at the MVista headquarters'
118 in Indiana, USA [16, 17, 20-22]. This is the main limitation to the use of the MV
119 test in other parts of the globe.

120 In 1989 Wheat and colleagues (Miravista Lab) developed a rapid and promising
121 method for the detection of urinary antigens in DH, detecting antigens in 90% of
122 urine and 50% of blood samples in patients with DH [23]. The test demonstrated
123 the use of an alternative methodology to monitor the disease in patients treated
124 with amphotericin B [23]. In 2006 the test was upgraded to its second
125 generation eliminating false positives from the previous method [22].

126 The IMMY® ALPHA ELISA kit (IMMY, Norman, OK) is 2-step sandwich-type
127 immunoenzymatic assay using polyclonal antibodies which quantitatively
128 detects *Histoplasma* antigens in urine samples. It can be used in addition to
129 other diagnostic techniques such as culture, histological and radiology. In 2007
130 Cloud and colleagues at the Institute for Clinical and Experimental Pathology at
131 the University of Utah developed and validated the Immy test [13]. The new test

132 is an alternative to the non-commercial test implemented by the MVD
133 laboratory, detecting policlonal antibodies in urine samples as a enzyme
134 immunoassay test [13]. Comparison tests resulted in 98% positivity compared
135 to 92% of the MVD test; in defense of the MVD laboratory, Lemonte argues the
136 unknown sensitivity for the Immy test, and proves by using the Immy tates its
137 sensitivity of 84% (compared to 92% of the MVD) [24]. The main disadvantage
138 of the IMMY test is the cross-reactivity with dimorphic fungal culture filtrate
139 antigens of *C. immitis*, *P. brasiliensis* and *B. dermatiditis* [13]. Additional
140 limitations for the IMMY test is that the test has been validated only in urine
141 samples and cannot be used for other biological samples, such as serum or
142 broncoalveolar lavage fluid. [17, 22].

143 In response to the LeMonte article, Cloud and colleagues criticize the MVD test,
144 arguing that the MVD test presents both technical and clinical failures along with
145 the fact that it presents cross-reactivity with galactomannan.

146 [24, 25]. In 2013 Theel and colleagues compare both IMMY and MVD tests (*H.*
147 *capsulatum* GM ASR EIA.), demonstrating 97.6% of positivity and 99.8%
148 specificity in comparison with the MVD test but with sensitivity of only 64.5%
149 (following the manufacturer' recommendation). The article points out that the
150 MVD identified patients negative for the IMMY test, that both methods present
151 cross-reactions and that they both captured 11/11 (100%) of urinary antigen
152 [15].

153 The recent news is that IMMY is about to launch an ELISA kit using monoclonal
154 antibodies against *H. capsulatum* that promise to be more sensitive and specific
155 than the current assay based on polyclonal antibodies. Hamilton and colleagues
156 used monoclonal antibodies screening cross-reactivity with dimorphic fungi with

157 similar antigens as *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Sporothrix* e *Paracoccidioides*
158 species [26]. In 2015 Theel and colleagues updated the cut-off points, optimized
159 the IMMY GM ASR test (using monoclonal antibodies) and performed a
160 comparison with the MVista EIA, detecting *Histoplasma* earlier than the MVista
161 EIA test [27]. The lateral flow test is also under development by IMMY and may
162 allow for a real point-of-care diagnosis for histoplasmosis, as it is available for
163 cryptococcosis.

164 With the increase numbers of patients infected with the HIV in developing
165 countries, the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) developed
166 an in house enzyme-linked immunosorbent assay for *H. capsulatum* detection.
167 The test was validated in a study conducted in Guatemala [14]. This assay
168 identifies specific *H. capsulatum* antigens using polyclonal antibodies. The
169 validation process was conducted with internal controls and standard curves,
170 thereby increasing sensitivity and specificity, with 81% sensitivity and 95%
171 specificity for the diagnosis of histoplasmosis. Cross-reactions occurred for
172 patients with paracoccidioidiomycosis. Similar results were obtained in a study
173 conducted in Colombia, with 86% sensitivity and 94% specificity [14, 28].

174 The detection of galactomannan (GM), a polysaccharide that is mostly found in
175 the cell wall of *Aspergillus* species, is largely used in clinical practice for the
176 diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients. Since in the HIV
177 population histoplasmosis is far more common than aspergillosis, GM detection
178 has been suggested as a potentially helpful diagnostic test for histoplasmosis in
179 these patients [6, 29-32]. In a prospective study in which 78 HIV patients with
180 suspected DH were included, GM testing in the urine had limited sensitivity
181 (12.5%) in the diagnosis of DH (Hoffmann E, submitted manuscript).

182 **Molecular methods**

183 The development of polymerase chain reaction (PCR) methodologies for *H.*
184 *capsulatum* has been the focus of many laboratories for a more rapid and
185 sensitive detection of such agent in tissue and body fluids. In order to achieve a
186 higher sensitivity and specificity a number of PCR methods targeting different
187 regions of the *H. capsulatum* genome were created, including conventional,
188 nested, and real time PCR [4, 33, 34]. These PCR methods are more sensitive
189 and specific than immunological or serological testing, but the absence of
190 commercially available FDA-approved methods (most PCR based methods
191 are homebrew technology without external validation) limit the generalization of
192 *Histoplasma* PCR results [34].

193 Based on the search and inclusion criteria, only three works were selected
194 when considering molecular methods (Tang et al. 2006, Maubon et al. 2007 e
195 Babady et al. 2001). Molecular biology methods vary according different PCR
196 methodologies that might be influenced by different DNA targets, reagents
197 primers, probes and platforms.

198 Babady et al in 2001 developed and validated a real-time PCR assay using 797
199 different clinical samples (not including urine), showing sensitivity of 73%
200 (11/15) and specificity of 100% (782/782) for *H. capsulatum* [4]. Using urine
201 samples Tang and colleagues tested 51 urine already known for the antigen
202 positive (MVD) plus 25 urine samples from healthy subjects, the test sensitivity
203 was low with only 4 (7.8%) positive samples from 51 positive to *H. capsulatum*
204 [33]. Maubon and colleagues used the method of nested PCR in 40 different
205 samples from patients suspected of disseminated histoplasmosis, according to

206 the authors of the study showed 100% sensitivity and specificity for
207 histoplasmosis [34].

208 The Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a nucleic acid
209 amplification technique based on the helicase activity of *Bst* polymerase from
210 *Bacillus stearothermophilus*). One of the advantages of the LAMP technique
211 relies on the fact that the *Bst* polymerase is cheaper than *Taq* enzyme (used in
212 PCR reactions). Also, it involves minimum handling time and material usage.
213 Since results may be interpreted using UV light the assay may be used in
214 resource-limited laboratories. Although promising, LAMP methodology present
215 some weakness at this time: first, the method was only tested in urine samples;
216 second, both sensitivity 4/6 (67%) and specificity (100%) remain to be
217 elucidated, the method showed an average detection limit of 6 genomes; and
218 third, the difficulty of extracting high-quality fungal DNA through a rapid and
219 inexpensive process remains challenging [35].

220 **Conclusions**

221 Even presenting a cosmopolitan distribution, the exact frequency of
222 histoplasmosis is still not known across the world, as only a few laboratories are
223 equipped, prepared and able to correctly perform the diagnosis.

224 According to the Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI), DH is a
225 prevalent disease in AIDS patients (15.4 cases/1,000 people/year) with a
226 overall mortality as high as 45.3%. There is a major need for the implementation
227 of global traceability system for a better understanding of the disease [36].

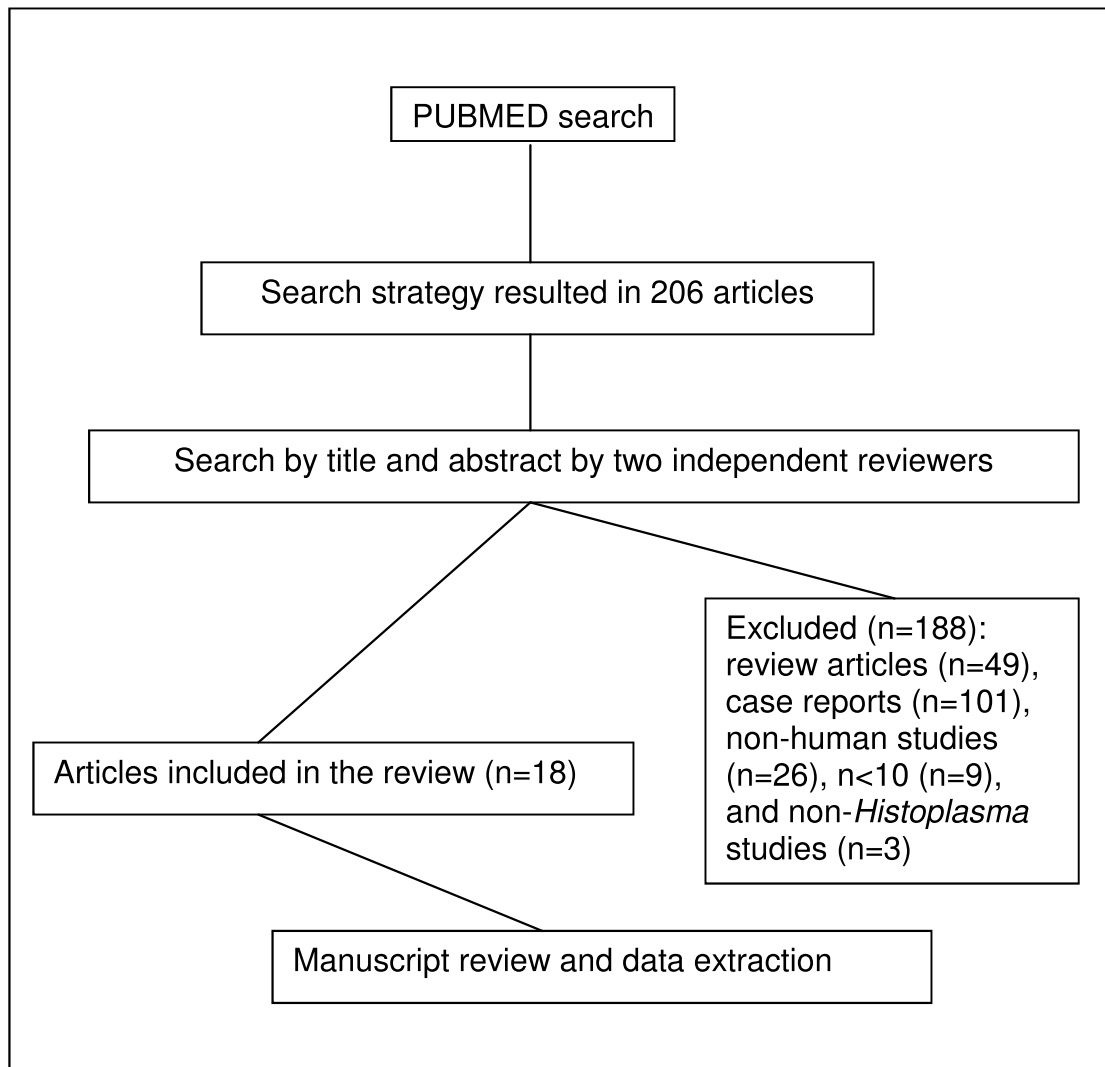
228 Diagnosis of disseminated histoplasmosis is now possible at early stages using
229 non-culture-based methods, thus being able to identify and diagnose within

230 hours, reducing hospitalization costs, and increased patient survival. Several
231 diagnostic methods have been developed in this regard, in particular
232 immunologic methods for the detection of *Histoplasma* antigens in urine
233 samples, and real time PCR. Even though these infections are endemic in
234 several countries in the American continent, there is an urgent need to provide
235 these countries with these newer, faster, and sensitive techniques, in order to
236 improve patient's outcome and make a better use of medical resources in
237 clinical practice.

Appendices

Figures

Figure 1: Flow up of search strategy of articles using Pubmed.



239 **References**

- 240 1. Wheat L. Diagnosis and management of histoplasmosis. *Eur J Clin*
241 *Microb Infect Dis* 1989; 8: 480-490.
- 242 2. Aidé MA. Capítulo 4-Histoplasmosis. *J Bras Pneumol: Soc Bras Pneumo*
243 *Tisilogia*. 2009;35:1145-51.
- 244 3. Baddley JW, Bartlett JG, Mitty J. Diagnosis and treatment of
245 histoplasmosis in HIV-infected patients. *Wolters Kulwer Health* 2014.
- 246 4. Babady NE, Buckwalter SP, Hall L, Le Febre KM, Binnicker MJ,
247 Wengenack NL. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma*
248 *capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time
249 PCR. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3204-3208.
- 250 5. Gutierrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat LJ. Detection
251 of *Histoplasma capsulatum* antigen in Panamanian patients with disseminated
252 histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:681-683.
- 253 6. Ranque S, Pelletier R, Michel-Nguyen A, Dromer F. *Platelia aspergillus*
254 assay for diagnosis of disseminated histoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect*
255 *Dis* 2007; 26: 941-943.
- 256 7. Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of
257 histoplasmosis. *Bras J Microbiol* 2006; 37: 1-13.
- 258 8. Kauffman CA. Histoplasmosis: A clinical and laboratory update. *Clin*
259 *Microbiol Rev* 2007; 20: 115-132.
- 260 9. Arango-Bustamante K, Restrepo A, Cano LE, de Bedout C, Tobon AM,
261 Gonzalez A. Diagnostic value of culture and serological tests in the diagnosis of
262 histoplasmosis in HIV and non-HIV Colombian patients. *Am J Trop Med Hyg*.
263 2013;89:937-942.

- 264 10. Soares JLM, Rosa DD, Leite VRS, Pasqualotto AC. Métodos
265 diagnósticos: Consulta rápida: Artmed; 2002.
- 266 11. Gerber JD, Riley RE, Jones RD. Evaluation of a microtiter latex
267 agglutination test for histoplasmosis. *Appl Microbiol.* 1972; 24:191-197.
- 268 12. Shipe E. Comparison of a fluorescent antibody inhibition test with
269 histoplasmin-complement-fixation and histoplasmin latex agglutination tests for
270 histoplasmosis. *Public Health Lab.* 1963; 21:169-177.
- 271 13. Cloud JL, Bauman SK, Neary BP, Ludwig KG, Ashwood ER.
272 Performance characteristics of a polyclonal enzyme immunoassay for the
273 quantitation of *Histoplasma* antigen in human urine samples. *Ame J Clin Pathol.*
274 2007;128:18-22.
- 275 14. Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, et
276 al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to
277 detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients.
278 *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:852-858.
- 279 15. Theel ES, Jespersen DJ, Haring J, Mandrekar J, Binnicker MJ.
280 Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of *Histoplasma*
281 *capsulatum* antigen from urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3555-3559.
- 282 16. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated
283 histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and
284 urine specimens. *N Engl J Med.* 1986; 314:83-88.
- 285 17. Connolly PA, Durkin MM, LeMonte AM, Hackett EJ, Wheat LJ. Detection
286 of histoplasma antigen by a quantitative enzyme immunoassay. *Clin Vaccine*
287 *Immunol.* 2007; 14:1587-1591.

- 288 18. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A,
289 et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J Clin*
290 *Microbiol.* 1997; 35:2618-2622.
- 291 19. Zimmerman SE, Stringfield PC, Wheat LJ, French ML, Kohler RB.
292 Comparison of sandwich solid-phase radioimmunoassay and two enzyme-
293 linked immunosorbent assays for detection of *Histoplasma capsulatum*
294 polysaccharide antigen. *J Infect Dis.* 1989; 160:678-685.
- 295 20. Connolly-Stringfield P, Kohler R. *Histoplasma capsulatum* polysaccharide
296 antigen detection in diagnosis and management of disseminated histoplasmosis
297 in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1989;
298 87:396-400.
- 299 21. Durkin MM, Connolly PA, Wheat LJ. Comparison of radioimmunoassay
300 and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma*
301 *capsulatum* var. *capsulatum* antigen. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2252-2255.
- 302 22. Wheat L, Connolly P, Durkin M, Book B, Pescovitz M. Elimination of
303 false-positive *Histoplasma* antigenemia caused by human anti-rabbit antibodies
304 in the second-generation *Histoplasma* antigen assay. *Transpl Infect Dis.* 2006;
305 8:219-221.
- 306 23. Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Kohler RB, Frame PT, Gupta MR.
307 *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen detection in diagnosis and
308 management of disseminated histoplasmosis in patients with acquired
309 immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1989;87:396-400.
- 310 24. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the
311 IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of
312 histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:802-803.

- 313 25. Cloud JL, Bauman SK, Pelfrey JM, Ashwood ER. Biased report on the
314 IMMY ALPHA Histoplasma antigen enzyme immunoassay for diagnosis of
315 histoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1389-1391.
- 316 26. Hamilton A, Bartholomew M, Fenelon L, Figueroa J, Hay R. A murine
317 monoclonal antibody exhibiting high species specificity for *Histoplasma*
318 *capsulatum* var. *capsulatum*. *J Gen Microbiol.* 1990; 136:331-335.
- 319 27. Theel ES, Harring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen
320 DJ. Reevaluation of Commercial Reagents for Detection of *Histoplasma*
321 *capsulatum* Antigen in Urine. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:1198-1203.
- 322 28. Caceres DH, Scheel CM, Tobón ÁM, Cleveland AA, Restrepo Á, Brandt
323 ME, et al. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay That Detects
324 *Histoplasma capsulatum* Antigenuria in Colombian Patients with AIDS for
325 Diagnosis and Follow-Up during Therapy. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21:1364-
326 1368.
- 327 29. Cummings JR, Jamison GR, Boudreaux JW, Howles MJ, Walsh TJ,
328 *aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis*
329 2007; 59: 113-115.
- 330 30. Husain S, Clancy C, Nguyen M, Swartzentruber S, Leather H, LeMonte
331 A, et al. Performance characteristics of the platelia *Aspergillus* enzyme
332 immunoassay for detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in
333 bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15:1760-1763.
- 334 31. Min Z, Baddley JW, Rodriguez JM, Moser SA, Patel M. Cross-reactivity
335 of *Aspergillus* galactomannan in an HIV-infected patient with histoplasmosis.
336 *Med Mycol.* 2012; 1:119-122.

- 337 32. Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso ICE, Severo LC. Cross-reactivity of
338 *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus*
339 species in the commercial Platelia Aspergillus enzyme immunoassay. *Clin*
340 *Vaccine Immunol.* 2009;16:132-133.
- 341 33. Tang YW, Li H, Durkin MM, Sefers SE, Meng S, Connolly PA, et al. Urine
342 polymerase chain reaction is not as sensitive as urine antigen for the diagnosis
343 of disseminated histoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 54:283-7.
- 344 34. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a
345 polymerase chain reaction method. Application on human samples in French
346 Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58:441-444.
- 347 35. Scheel CM, Zhou Y, Theodoro RC, Abrams B, Balajee SA, Litvintseva
348 AP. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for
349 detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.*
350 2014; 52:483-488.
- 351 36. Gaffi. Mycology reference laboratory transforms outcomes of
352 histoplasmosis in French Guiana 2015 [Available from:
353 [http://www.gaffi.org/mycology-reference-laboratory-transforms-outcomes-of-](http://www.gaffi.org/mycology-reference-laboratory-transforms-outcomes-of-histoplasmosis-in-french-guiana/)
354 [histoplasmosis-in-french-guiana/](http://www.gaffi.org/mycology-reference-laboratory-transforms-outcomes-of-histoplasmosis-in-french-guiana/)] Accessed: January, 30th 2016.

6. Considerações finais

Refletindo sobre os artigos em comparação com o presente estudo sabe-se que o *H. capsulatum* apresenta uma distribuição cosmopolita, mas a frequência exata da HD ainda não é conhecida em todo o mundo. Devido a esta falta de vigilância epidemiológica e a dificuldade no diagnóstico, sua real influência na morbimortalidade em pacientes que adquirem HD ainda é uma incógnita. A HD é uma doença que acomete principalmente pacientes imunodeprimidos assolados pelas complicações do HIV, de acordo com o Fundo Global de Ação para infecções fúngicas (Gaffi), a histoplasmose tem uma mortalidade global de 45,3%, mostrando necessidade da implementação de um sistema de rastreabilidade global para uma melhor compreensão da doença (Gaffi, 2015).

Este é o primeiro estudo conduzido prospectivamente para documentar a prevalência de histoplasmose em uma coorte de pacientes com HIV e suspeita de doença disseminada concomitantemente a nível nacional. A presença do *H. capsulatum* no Brasil é endêmica e não é considerada uma doença de notificação compulsória, assim desconhecendo sua prevalência e distribuição geográfica no país. Além disso, este é o primeiro estudo no Brasil a utilizar testes de diagnóstico para detecção do antígeno urinário para *H. capsulatum* e a primeira revisão sistemática mostrando as vantagens e desvantagens dos testes alternativos à cultura do mesmo.

Os resultados deste estudo mostraram que tanto os testes implementados pelo CDC quanto IMMY® obtiveram um desempenho melhor do que os métodos de diagnóstico clássicos (cultura e histopatologia) em pacientes que apresentavam AIDS com suspeita de histoplasmose

disseminada. Ademais, o teste CDC Histoplasma EIA não havia sido comparado com testes comerciais, tais como o teste IMMY® EIA e Platelia™ Aspergillus GM, também é importante mencionar que o CDC não vai mais apoiar o seu teste do antígeno EIA. Ao final da pesquisa os testes IMMY® e CDC detectaram todos os casos de histoplasmose disseminada que haviam sido diagnosticados por métodos clássicos. O método IMMY® detectou 62,5% casos adicionais de histoplasmose disseminada em comparação aos métodos clássicos. Estudos anteriores conduzidos por Cummings (2007), Ranque (2007) e Xavier (2008) já demonstraram que o teste Platelia™ Aspergillus GM pode reagir de forma cruzada com *H. capsulatum*, sugerindo a utilização deste teste para rastrear possíveis pacientes com HD. Em nosso estudo o desempenho para o teste GM em amostras de urina dos pacientes com suspeita de HD mostrou baixa sensibilidade (12,5%).

Na avaliação das fichas clínicas foi possível observar e validar preditores clínicos para histoplasmose em pacientes com AIDS junto com suspeita de doença disseminada. Utilizando métodos clássicos como referência além dos novos métodos de ELISA na urina, foi observada a presença de úlceras orais e considerada um forte preditor para diagnóstico de histoplasmose disseminada, isso ocorreu independentemente do padrão de ouro escolhido (métodos clássicos, IMMY® ou CDC). Outras variáveis de importância foram sintomas pulmonares, linfonomegalias mediastinais e lesões de pele (pápulas). Esses critérios clínicos corroboram com a literatura já mostrados por Goldani (2009) e Vidyanath (2013). Outro achado importante foi a tuberculose disseminada, observada em 13 pacientes, instigando à necessidade do diagnóstico

diferencial, também relatada na literatura por Baddley (2014) a co-existência de *H. capsulatum* e *M. tuberculosis*.

Ao final os estudos mostraram grande relevância no diagnóstico de HD através dos métodos alternativos em comparação aos métodos clássicos. Além de ser o primeiro estudo a mostrar a prevalência da HD de acordo com o padrão-ouro (10,2%), IMMY (16,7%) e teste CDC (17,9%), a detecção de antígenos de *Histoplasma* na urina por métodos de EIA melhorou a sensibilidade diagnóstica acima de 40%, em comparação com os métodos de diagnósticos clássicos. Através destes métodos não baseados em cultivo agora é possível o diagnóstico da histoplasmose disseminada em fases iniciais da doença, identificar e diagnosticar em apenas algumas horas, reduzir custos de hospitalização e aumentar a sobrevida do paciente.

Atualmente vários métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos, em particular, métodos imunológicos para a detecção de antígenos em amostras de urina e PCR em tempo real. Neste momento encontram-se em fase desenvolvimento estudos e projetos com anticorpos monoclonais no laboratório de biologia molecular da Santa Casa de Porto Alegre/Brasil, em articulação com uma rede maior de centros médicos, para melhor reportar a frequência de histoplasmose nas mais diferentes regiões do Brasil.

7.Anexos

Anexo I: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Anexo II: Ficha clínica

Anexo III: Tabela das características clínicas

Anexo I: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Estudo: Histoplasmose em pacientes portadores de HIV/SIDA no Brasil

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a presença de *Histoplasma* como causa de infecção em pacientes com o vírus da AIDS (HIV). Com os métodos atualmente disponíveis, é muito difícil saber se esta infecção está presente, sendo que ela pode causar a morte. Neste estudo, testaremos sua urina para a presença deste fungo.

Sua participação é voluntária e nenhuma forma de pagamento ocorrerá no estudo. A decisão de não participar não afetará seu tratamento ou relação com seus médicos de maneira alguma. O teste será reproduzido de acordo com estudo publicado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), órgão do governo americano que investiga doenças.

Será preciso que você assine duas vias deste termo. Uma ficará com você e a outra com o médico do estudo. Após sua concordância em participar do estudo, você deverá urinar em um frasco próprio para a coleta de urina, o volume aproximado de 20 mL (meio frasco). Sua urina será enviada para o Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Porto Alegre, onde será feito o teste para pesquisa do fungo. Os resultados serão repassados ao seu médico, que decidirá sobre o seu tratamento. Revisaremos seu prontuário médico para saber mais sobre o estado de sua doença. Todas as informações do estudo são sigilosas, incluindo seu nome, sua doença e resultado de seus exames. A entrada no estudo não trará qualquer custo a você ou ao hospital. Você não terá nenhum risco em participar deste estudo. Como potencial benefício, você poderá tomar conhecimento caso esteja com infecção por este

fungo; ainda, os resultados gerados por este estudo poderão ajudar muitos outros pacientes que estejam doentes com o mesmo problema.

Você pode fazer perguntas a qualquer momento sobre este estudo ao Dr. Alessandro Pasqualotto (coordenador do projeto) pelo telefone 51 99951614; 51 3213 7490. O endereço profissional é o seguinte: Laboratório de Biologia Molecular Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Avenida Independência 155 (Hospital Dom Vicente Scherer)- 8º andar (Heliponto) - CEP 90035-074. Em caso de dúvidas adicionais sobre este termo ou seus direitos, favor contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo número 51 32148571.

Li e compreendi as informações e estou de acordo em participar do estudo.

A ser preenchido pelo paciente ou representante:

Nome: _____ Assinatura:

Data: __/__/____

A ser preenchido pelo pesquisador que aplicou este termo:

Nome: _____ Assinatura:

Data: __/__/____

Para sujeito de pesquisa analfabeto, usar o campo abaixo

Este formulário foi lido para _____ (nome do paciente) em ____/____/____ (data) pelo _____ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

Assinatura da Testemunha

Nome:

Data: ____/____/____

Anexo II: Ficha clínica

Estudo: Histoplasmosse em pacientes portadores de HIV/SIDA no Brasil

INFORMAÇÃO DO PACIENTE	
Data de coleta das amostras: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)	Hospital:
Iniciais do nome do paciente:	Código do Paciente:
Data do início dos sintomas: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)	Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino
Data de nascimento: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) Cidade/Estado de nascimento: ___/___ Morou em outro Estado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido Se Sim, qual ___	Idade: _____ <input type="checkbox"/> dia <input type="checkbox"/> mês <input type="checkbox"/> ano Endereço de Residência: _____ _____ _____
Sobre a infecção pelo HIV	
Data do diagnóstico de HIV: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) <input type="checkbox"/> Não obtido	Já tratava com ARV (antiretroviral) na última consulta? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido
Contagem de CD4: _____ células/mm ³ Data de contagem do CD4: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) Contagem de CD8 : _____ células/mm ³ Data de contagem do CD8: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)	Carga viral do HIV: _____ cópias/ml Data de contagem da CV: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)
Diagnóstico prévio de histoplasmosse? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	Data do diagnóstico prévio: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)
Doença oportunista <input type="checkbox"/> TB prévia: <input type="checkbox"/> PCP	<input type="checkbox"/> CMV <input type="checkbox"/> Linfoma SNC

	<input type="checkbox"/> Criptococose	<input type="checkbox"/> Candidose (forma clínica)
	<input type="checkbox"/> Toxoplasmose SNC	_____
		<input type="checkbox"/> Outra infecção (especificar)
	_____	_____

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HISTOPLASMOSE

Profissão atual:	Procedência:
Profissão (ões) anteriores:	Naturalidade:
	Moradias anteriores:

Exposição a risco específico:	<input type="checkbox"/> Atividade rural	<input type="checkbox"/> Túnel
	<input type="checkbox"/> Exposição a pássaros	<input type="checkbox"/> Galinheiro/ Granja
	<input type="checkbox"/> Trabalha com construção civil/ demolição	
	<input type="checkbox"/> Exposição a outros locais com morcegos. Qual _____	
	<input type="checkbox"/> Cavernas	<input type="checkbox"/> Outros:

SINAIS E SINTOMAS RELACIONADOS À HISTOPLASMOSE

Manifestações gerais:	Sudorese noturna: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido
Febre: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	Perda de peso: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido
Fraqueza <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	Qual a perda? _____ Em quanto
Anorexia <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	tempo? _____

Sintomas pulmonares: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	Lesão oral: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido
<input type="checkbox"/> Dispnéia <input type="checkbox"/> Tosse seca <input type="checkbox"/> Tosse produtiva	Localização: <input type="checkbox"/> Tonsilas <input type="checkbox"/> Faringe
<input type="checkbox"/> Hemoptise <input type="checkbox"/> Sibilância <input type="checkbox"/> Dor torácica	<input type="checkbox"/> Língua
Descrição de sintomas respiratórios:	<input type="checkbox"/> Gengiva <input type="checkbox"/> Mucosa oral <input type="checkbox"/> Laringe
_____	Tipo: <input type="checkbox"/> Ulcerações <input type="checkbox"/> Placas <input type="checkbox"/> Verrucosas
	<input type="checkbox"/> Pápulas

	Descrição das lesões orais:
Manifestações abdominais: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Náusea <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Esplenomegalia <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Dor abdominal <input type="checkbox"/> Enterorragia <input type="checkbox"/> Disfagia <input type="checkbox"/> Ulceração na mucosa TGI <input type="checkbox"/> Pseudopólipos <input type="checkbox"/> Placas <input type="checkbox"/> Envolvimento do intestino grosso Descrição das manifestações abdominais: _____ _____ _____	Linfonodos aumentados: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido <input type="checkbox"/> Hilares <input type="checkbox"/> Cervicais <input type="checkbox"/> Axilares <input type="checkbox"/> Adenomegaliageneraliz. <input type="checkbox"/> Outros - Especificar: _____ Descrição da linfadenopatia: _____ _____ _____ _____ _____ _____
Lesões de pele: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido <input type="checkbox"/> Rash <input type="checkbox"/> Mácula <input type="checkbox"/> Pápulas <input type="checkbox"/> Pápulas com crostas <input type="checkbox"/> Placa <input type="checkbox"/> Placa com crosta <input type="checkbox"/> Pústula <input type="checkbox"/> Nódulo <input type="checkbox"/> Celulite <input type="checkbox"/> Eritemato-violáceas <input type="checkbox"/> Úlceras/Erosões Descrição das lesões de pele:	Sintomas e sintomas neurológicos: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido <input type="checkbox"/> Déficit neurológico focal <input type="checkbox"/> Confusão mental <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Meningite crônica <input type="checkbox"/> Meningite aguda <input type="checkbox"/> Convulsões <input type="checkbox"/> Hidrocefalia <input type="checkbox"/> Hipertensão intracraniana

	Descrição das manifestações neurológicas:

ACHADOS DE IMAGENS DA HISTOPLASMOSE

Sim Não Não obtido

TÓRAX:

Pulmão:

Normal Padrão miliar Padrão intersticial Consolidação

Infiltrado reticulonodular Infiltrado focal Infiltrado difuso Derrame pleural Adenopatia mediastinal

Fibrose pulmonar Granuloma Granuloma calcificado Cavidades Broncolitíase

Anormalidades Bilaterais: Sim Não Não obtido

LSD LID LM LSE LIE Mediastino

Outros achados pulmonares:

ABDÔMEN:

Comprometimento da adrenal, a saber: Necrose Calcificações Aumento de volume

Hepatomegalia Esplenomegalia Adenomegalias intra-abdominais

SISTEMA NERVOSO CENTRAL:

Abscesso cerebral Meningite Ventriculite Aracnoidite

Lesão simples Lesões múltiplas

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE HISTOPLASMOSE

Data do diagnóstico de histoplasmose: ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

Diagnóstico de histoplasmose (no hospital local): Sorologia: Imunofluorescência Direta

<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <u>Testes realizados:</u> <input type="checkbox"/> Micológico direto – material analisado: _____ Resultado:	Immunoblotting Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Proteína C reativa Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> LDH Valores normais: _____ Resultado: _____
<input type="checkbox"/> Cultura – material analisado: _____ Resultado:	<input type="checkbox"/> Fosfatase alcalina Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Ferritina Valores normais: _____ Resultado: _____
<input type="checkbox"/> Biópsia - material analisado: _____ Resultado:	<input type="checkbox"/> Aminotransferases Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Gama GT Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Hemoglobina Valores normais: _____ Resultado: _____
<input type="checkbox"/> Leveduras em sangue periférico Resultado:	<input type="checkbox"/> Plaquetas Valores normais: _____ Resultado: _____ <input type="checkbox"/> Leucócitos Valores normais: _____ Resultado: _____
Pancitopenia: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não obtido	<input type="checkbox"/> Linfócitos Valores normais: _____ Resultado: _____

MEDICAMENTOS ANTIFÚNGICOS

Foram prescritos medicamentos antifúngicos? Sim Não Não obtido

Os medicamentos prescritos foram todos para tratamento de histoplasrose? Sim Não Não obtido

Se sim, quais?	Data que iniciou	Data da última dose	Quantidade da última dosagem (mg/d)
<input type="checkbox"/> Fluconazol	___/___/___	___/___/___	
<input type="checkbox"/> Itraconazol	___/___/___	___/___/___	
<input type="checkbox"/> Anfotericina B convencional	___/___/___	___/___/___	
<input type="checkbox"/> Anfotericina B formulação lipídica	___/___/___	___/___/___	
<input type="checkbox"/> Sulfametoxazol	___/___/___	___/___/___	
<input type="checkbox"/> Outra medicação (especificar)	___/___/___	___/___/___	

RESULTADOS

Data da última consulta: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) – Seguimento de até 30 dias.

Resultado da última consulta: Sobreviveu Morreu *Data da morte:* ___/___/___ (dd/mm/aaaa)

Não obtido

Outros resultados ou observações:

Anexo III: Tabela das características clínicas

Variável	Cultura/Histopatológico (n=8)				Teste CDC (n=14)				Teste IMMY® (n=13)				Platelia™ (n=5)		
	Positivo	Negativo	Valor p		Positivo	Negativo	Valor p		Positivo	Negativo	Valor p		Positivo	Negativo	Valor p
Dados demográficos															
Sexo masculino, n (%)	4 (50,0)	47 (67,1)	0,437		10 (71,4)	41 (64,1)	0,760		8 (51,5)	43 (66,2)	0,749		3 (60,0)	48 (65,8)	1,000
Idade em anos, média (sd)	42,2 (11,6)	44,7 (10,2)	0,618		38,8 (8,4)	45,4 (10,4)	0,019		41,6 (9,5)	44,7 (10,5)	0,297		48,0 (11,3)	43,9 (10,3)	0,481
Referente à infecção pelo HIV															
Não tratavam com TARV, n (%)	6 (75,0)	36 (51,4)	0,275		9 (64,3)	33 (51,6)	0,387		6 (46,2)	35 (53,8)	1,000		3 (60,0)	39 (53,4)	1,000
Carga viral HIV, em log; mediana (min-max)	5,56 (5,09-6,15)	5,13 (indet- >7,00)	0,234		5,74 (3,57 - >7,00)	5,05 (indet- 6,55)	0,014		5,30 (1,83-6,92)	5,15 (indet- >7,00)	0,409		5,81 (1,83-6,25)	5,17 (indet- >7,00)	0,492
CD4, mediana de células/mm ³ (min-max)	26 (5-1169)	70 (1-1453)	0,070		22 (5-184)	74 (1-1453)	0,008		22 (3-288)	72 (1-1.453)	0,012		94 (22-320)	52 (1-1.453)	0,570
CD8, mediana de células/mm ³ (min-max)	277 (48-720)	389 (54-14447)	0,142		344 (48-807)	349 (54-14447)	0,903		292 (48-807)	383 (54-14447)	0,442		539 (258-789)	326 (48-14447)	0,461
Infecções oportunistas prévias															
Tuberculose, n (%)	1 (12,5)	27 (38,6)	0,247		6 (42,9)	22 (34,4)	0,549		3 (23,1)	25 (38,5)	0,357		3 (60,0)	25 (34,2)	0,344
Pneumocitose, n (%)	0 (0,0)	9 (12,9)	0,586		2 (14,3)	7 (10,9)	0,660		0 (0,0)	9 (13,8)	0,342		0 (0,0)	9 (12,3)	1,000
Criptococose, n (%)	0 (0,0)	7 (10,0)	1,000		1 (7,1)	6 (9,4)	1,000		1 (7,7)	6 (9,2)	1,000		0 (0,0)	7 (9,6)	1,000
Toxoplasmose, n (%)	0 (0,0)	13 (18,6)	0,339		1 (7,1)	12 (18,8)	0,443		1 (7,7)	12 (18,5)	0,683		1 (20,0)	12 (16,4)	1,000
Citomegalovirose, n (%)	0 (0,0)	6 (8,6)	1,000		1 (7,1)	5 (7,8)	1,000		0 (0)	6 (9,2)	0,582		0 (0,0)	6 (8,2)	1,000
Candidiose, n (%)	3 (37,5)	13 (18,6)	0,350		4 (28,6)	12 (18,8)	0,469		2 (15,4)	14 (21,5)	1,000		1 (20,0)	15 (20,5)	1,000
Fatores de exposição															
Atividades rurais, n (%)	1 (12,5)	9 (12,9)	0,729		3 (21,4)	7 (10,9)	0,373		2 (15,4)	8 (12,3)	0,670		1 (20,0)	9 (12,3)	0,506
Passaros, n (%)	3 (37,5)	17 (24,3)	0,334		6 (42,9)	14 (21,9)	0,173		5 (38,5)	15 (23,1)	0,246		0 (0,0)	20 (27,4)	0,320
Construção civil, n (%)	1 (12,5)	23 (32,9)	0,423		4 (28,6)	20 (31,3)	1,000		2 (15,4)	22 (33,8)	0,323		0 (0,0)	24 (32,9)	0,316
Morcegos, n (%)	3 (37,5)	6 (8,6)	0,045		3 (21,4)	6 (9,4)	0,199		3 (23,1)	6 (9,2)	0,167		0 (0,0)	9 (12,3)	1,000
Cavernas, n (%)	0 (0,0)	2 (2,9)	1,000		0 (0,0)	2 (3,1)	1,000		0 (0,0)	2 (3,1)	1,000		0 (0,0)	2 (2,7)	1,000
Túneis, n (%)	1 (12,5)	8 (11,4)	1,000		4 (21,4)	5 (7,8)	0,050		2 (15,4)	7 (10,8)	0,640		1 (20,0)	8 (11,0)	0,468
Galinheiros, n (%)	1 (12,5)	10 (14,3)	1,000		3 (21,4)	8 (12,5)	0,405		2 (15,4)	9 (13,8)	1,000		0 (0,0)	11 (15,1)	1,000
Dados clínicos (Exame clínico)															

Febre, n (%)	7 (87,5)	55 (78,6)	1,000	11 (78,6)	51 (79,1)	1,000	10 (76,9)	52 (80,0)	0,723	4 (80,0)	58 (79,5)	1,000
Fraqueza, n (%)	6 (75,0)	43 (61,4)	0,703	12 (85,7)	37 (57,8)	0,050	9 (69,2)	40 (61,5)	0,757	3 (60,0)	46 (63,0)	1,000
Sudorese noturna, n (%)	2 (25,0)	27 (38,6)	0,703	3 (21,4)	26 (40,6)	0,178	4 (30,8)	25 (28,5)	0,757	4 (80,0)	25 (34,2)	0,061
Anorexia, n (%)	8 (100,0)	53 (75,7)	0,189	12 (85,7)	49 (76,6)	0,722	11 (84,6)	50 (76,9)	0,722	2 (40,0)	59 (80,8)	0,066
Perda de peso, n (%)	7 (87,5)	56 (80,0)	1,000	13 (92,9)	50 (78,1)	0,282	12 (92,6)	51 (78,5)	0,443	4 (80,0)	59 (80,8)	1,000
Perda de peso, mediana (min-max) em Kg	15,5 (10-38)	10,0 (2-43)	0,053	13,0 (5-38)	10,0 (2-43)	0,221	14,0 (5-38)	10,0 (2-43)	0,113	7,5 (5-10)	10,0 (2-43)	0,389
Sintomas pulmonares, n (%)	8 (100,0)	53 (75,7)	0,189	12 (85,7)	49 (76,6)	0,722	12 (92,6)	49 (75,4)	0,277	5 (100)	56 (76,7)	0,580
Dispneia, n (%)	5 (62,5)	34 (48,6)	0,455	5 (35,7)	34 (53,1)	0,238	5 (38,5)	34 (52,3)	0,545	2 (40,0)	37 (50,7)	1,000
Tosse seca, n (%)	3 (37,5)	19 (27,1)	0,680	5 (35,7)	17 (26,6)	0,522	3 (23,1)	19 (29,2)	0,749	1 (20,0)	21 (28,8)	1,000
Tosse produtiva, n (%)	4 (50,0)	23 (32,9)	0,437	6 (42,9)	21 (32,8)	0,541	7 (53,8)	20 (30,8)	0,124	2 (20,0)	25 (34,2)	1,000
Hemoptise, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Sibilância, n (%)	0 (0,0)	6 (8,6)	1,000	0 (0,0)	6 (9,4)	0,584	0 (0,0)	6 (9,2)	0,582	1 (20,0)	5 (6,8)	0,337
Dor torácica, n (%)	1 (12,5)	16 (22,9)	0,678	1 (7,1)	16 (25,0)	0,281	2 (15,4)	15 (23,1)	0,722	1 (20,0)	16 (21,9)	1,000
Lesão oral, n (%)	4 (50,0)	31 (44,3)	1,000	7 (50,0)	28 (43,8)	0,670	8 (61,5)	27 (41,5)	0,186	3 (60,0)	32 (43,8)	0,652
Lesão nas tonsilas, n (%)	1 (12,5)	3 (4,3)	0,357	1 (7,1)	3 (4,7)	0,555	1 (7,7)	3 (4,6)	0,525	0 (0,0)	4 (5,5)	1,000
Lesão na faringe, n (%)	1 (12,5)	1 (1,4)	0,196	1 (7,1)	1 (1,6)	0,329	1 (7,7)	1 (1,5)	0,307	0 (0,0)	2 (2,7)	1,000
Lesão na língua, n (%)	1 (12,5)	8 (11,4)	1,000	2 (14,3)	7 (10,9)	0,660	3 (23,1)	6 (9,2)	0,167	2 (40,0)	7 (9,6)	0,099
Lesão na gengiva, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Lesão mucosa, n (%)	3 (37,5)	13 (18,6)	0,350	4 (28,6)	12 (18,8)	0,469	4 (30,8)	12 (18,5)	0,450	1 (20,0)	15 (20,5)	1,000
Ulceras orais, n (%)	4 (50,0)	5 (7,1)	0,005	5 (35,7)	4 (6,3)	0,008	5 (38,5)	4 (6,2)	0,005	0 (0,0)	9 (12,3)	1,000
Placas, n (%)	1 (12,5)	11 (15,7)	1,000	2 (14,3)	10 (15,6)	1,000	2 (15,4)	10 (15,4)	1,000	1 (20,0)	11 (15,1)	0,577
Queixas abdominais, n (%)	5 (62,5)	55 (78,6)	0,377	10 (71,4)	50 (78,1)	0,727	9 (69,2)	51 (78,5)	0,483	3 (60,0)	57 (78,1)	0,326
Diarréia, n (%)	4 (50,0)	24 (34,3)	0,448	5 (35,7)	23 (35,9)	0,987	5 (38,5)	23 (35,4)	0,833	1 (20,0)	27 (37,0)	0,649
Náusea, n (%)	2 (25,0)	19 (27,1)	1,000	4 (28,6)	17 (26,6)	1,000	3 (23,1)	18 (27,7)	1,000	0 (0,0)	21 (28,8)	0,316
Vômitos, n (%)	2 (25,0)	19 (27,1)	1,000	4 (28,6)	17 (26,6)	1,000	3 (23,1)	18 (27,7)	1,000	1 (20,0)	20 (27,4)	1,000
Esplenomegalia, n (%)	1 (12,5)	20 (28,6)	0,487	5 (35,7)	16 (25,0)	0,508	3 (23,1)	18 (27,7)	1,000	3 (60,0)	18 (24,7)	0,118
Hepatomegalia, n (%)	1 (12,5)	25 (35,7)	0,257	4 (28,6)	22 (34,4)	0,764	3 (23,1)	23 (35,4)	0,526	1 (20,0)	25 (34,2)	0,660
Dor abdominal, n (%)	1 (12,5)	21 (30,0)	0,429	1 (7,1)	21 (32,8)	0,097	2 (15,4)	20 (30,8)	0,330	1 (20,0)	21 (28,8)	1,000
Enterorragia, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000
Disfagia, n (%)	2 (25,0)	8 (11,4)	0,271	2 (14,3)	8 (12,5)	1,000	2 (15,4)	8 (12,3)	0,670	0 (0,0)	10 (13,7)	1,000
Ulceras gastrointestinais, n (%)	1 (12,5)	2 (2,9)	0,280	2 (14,3)	1 (1,6)	0,081	2 (15,4)	1 (1,5)	0,070	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000

Placas gastrointestinais, n (%)	1 (12,5)	1 (1,4)	0,196	1 (7,1)	1 (1,6)	0,329	1 (7,7)	1 (1,5)	0,307	0 (0,0)	2 (2,7)	1,000
Envolvimento do intestino grosso, n (%)	1 (12,5)	3 (4,3)	0,357	2 (14,3)	2 (3,1)	0,146	2 (15,4)	2 (3,1)	0,127	0 (0,0)	4 (5,5)	1,000
Linfonodos aumentados, n (%)	4 (50,0)	36 (51,4)	1,000	8 (57,1)	32 (50,0)	0,628	8 (61,5)	32 (49,2)	0,418	3 (60,0)	37 (50,7)	1,000
Linfonodos hilares, n (%)	0 (0,0)	6 (8,6)	1,000	0 (0,0)	6 (9,4)	0,584	0 (0,0)	6 (9,2)	0,582	0 (0,0)	6 (8,2)	1,000
Linfonodos cervicais, n (%)	2 (25,0)	20 (28,6)	1,000	4 (28,6)	18 (28,1)	1,000	4 (30,8)	18 (27,7)	1,000	1 (20,0)	21 (28,8)	1,000
Linfonodos retroperitoneais, n (%)	0 (0,0)	5 (7,1)	1,000	2 (14,3)	3 (4,7)	0,217	1 (7,7)	4 (6,2)	1,000	1 (20,0)	4 (5,5)	0,289
Linfonodos axilares, n (%)	1 (12,5)	10 (14,3)	1,000	2 (14,3)	9 (14,1)	1,000	2 (15,4)	9 (13,8)	1,000	0 (0,0)	11 (15,1)	1,000
Linfonodos inguinais, n (%)	1 (12,5)	6 (8,6)	0,546	2 (14,3)	5 (7,8)	0,603	1 (7,7)	6 (9,2)	1,000	0 (0,0)	7 (9,6)	1,000
Linfonodos abdominais, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000
Linfonodos mediastinais, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	1 (20,0)	2 (2,7)	0,182
Adenomegalia generalizada, n (%)	3 (37,5)	16 (22,9)	0,395	5 (35,7)	14 (21,9)	0,310	5 (38,5)	14 (21,5)	0,194	2 (40,0)	17 (23,3)	0,590
Lesão de pele, n (%)	3 (37,5)	31 (44,3)	1,000	7 (50,0)	27 (42,2)	0,593	8 (61,5)	26 (40,0)	0,221	3 (60,0)	31 (42,5)	0,648
Rash, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000
Mácula, n (%)	0 (0,0)	8 (11,4)	0,591	3 (21,4)	5 (7,8)	0,149	3 (23,1)	5 (7,7)	0,124	2 (40,0)	6 (8,2)	0,079
Papúla, n (%)	2 (25,0)	11 (15,7)	0,614	5 (35,7)	8 (12,5)	0,050	6 (46,2)	7 (10,8)	0,006	1 (20,0)	12 (16,4)	1,000
Papúla com crosta, n (%)	2 (25,0)	5 (7,1)	0,149	3 (21,4)	4 (6,3)	0,105	3 (23,1)	4 (6,2)	0,086	0 (0,0)	7 (9,6)	1,000
Placas, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Placas com crostas, n (%)	0 (0,0)	2 (2,9)	1,000	1 (7,1)	1 (1,6)	0,329	1 (7,7)	1 (1,5)	0,307	0 (0,0)	2 (2,7)	1,000
Pústula, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000
Nódulo, n (%)	0 (0,0)	6 (8,6)	1,000	0 (0,0)	6 (9,4)	0,584	1 (7,7)	5 (7,7)	1,000	1 (20,0)	5 (6,8)	0,337
Celulite, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Eritema violáceo, n (%)	0 (0,0)	7 (10,0)	1,000	1 (7,1)	6 (9,4)	1,000	0 (0,0)	7 (10,8)	0,594	1 (20,0)	6 (8,2)	0,383
Ulceras com erosões, n (%)	3 (37,5)	10 (14,3)	0,124	5 (35,7)	8 (12,5)	0,050	5 (38,5)	8 (12,3)	0,036	0 (0,0)	13 (17,8)	0,583
Sinais e sintomas neurológicos, n (%)	3 (37,5)	35 (50,0)	0,712	3 (21,4)	35 (54,7)	0,024	3 (23,1)	35 (53,8)	0,067	2 (40,0)	36 (49,3)	1,000
Déficit neurológico, n (%)	1 (12,5)	7 (10,0)	1,000	0 (0,0)	8 (12,5)	0,338	0 (0,0)	8 (12,3)	0,339	0 (0,0)	8 (11,0)	1,000
Confusão, n (%)	1 (12,5)	13 (18,6)	1,000	1 (7,1)	13 (20,3)	0,444	1 (7,7)	13 (20,0)	0,443	0 (0,0)	14 (19,2)	0,579
Cefaléia, n (%)	1 (12,5)	25 (35,7)	0,257	2 (14,3)	24 (37,5)	0,124	1 (7,7)	25 (23,5)	0,050	1 (20,0)	25 (34,2)	0,660
Convulsão, n (%)	0 (0,0)	5 (7,1)	1,000	0 (0,0)	5 (7,8)	0,579	0 (0,0)	5 (7,7)	0,583	0 (0,0)	5 (6,8)	1,000
Dados clínicos (Exames de Imagem)												
Pulmão normal, n (%)	0 (0,0)	8 (11,4)	0,591	2 (14,3)	6 (9,4)	0,629	3 (23,1)	5 (7,7)	0,124	2 (40,0)	6 (8,2)	0,079

Padrão miliar, n (%)	2 (25,0)	6 (8,6)	0,188	4 (28,4)	4 (6,3)	0,031	3 (23,1)	5 (7,7)	0,124	1 (20,0)	7 (9,6)	0,427
Padrão intersticial, n (%)	0 (0,0)	2 (2,9)	1,000	1 (7,1)	1 (1,6)	0,329	0 (0,0)	2 (3,1)	1,000	1 (20,0)	1 (1,4)	0,125
Consolidação, n (%)	3 (37,5)	26 (37,1)	1,000	5 (35,7)	24 (37,5)	0,900	5 (38,5)	24 (36,9)	0,917	3 (60,0)	26 (35,6)	0,355
Infiltrado reticulonodular, n (%)	3 (37,5)	5 (7,1)	0,032	3 (21,4)	5 (7,8)	0,149	2 (15,4)	6 (9,2)	0,614	0 (0,0)	8 (11,0)	1,000
Infiltrado focal, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	0 (0,0)	3 (4,1)	1,000
Infiltrado difuso, n (%)	2 (25,0)	16 (22,9)	1,000	1 (7,1)	3 (4,7)	1,000	2 (15,4)	16 (24,6)	0,721	0 (0,0)	18 (24,7)	0,584
Derrame pleural, n (%)	1 (12,5)	13 (18,6)	1,000	1 (7,1)	17 (26,6)	0,169	1 (7,7)	13 (20,0)	0,443	0 (0,0)	14 (19,2)	0,579
Adenomatia mediastinal, n (%)	4 (50,0)	10 (14,3)	0,031	5 (35,7)	9 (14,1)	0,116	5 (38,5)	9 (13,8)	0,035	1 (20,0)	13 (17,8)	1,000
Fibrose pulmonar, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Granuloma, n (%)	1 (12,5)	3 (4,3)	0,357	1 (7,1)	3 (4,7)	0,555	1 (7,7)	3 (4,6)	0,525	0 (0,0)	4 (5,5)	1,000
Granuloma calcificado, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	0 (0,0)	3 (4,6)	1,000	1 (20,0)	2 (2,7)	0,182
Cavidades, n (%)	1 (12,5)	6 (8,6)	0,546	1 (7,1)	6 (9,4)	1,000	1 (7,7)	6 (9,2)	1,000	2 (40,0)	5 (6,8)	0,061
Anormalidades abdominais, n (%)	2 (25,0)	40 (57,1)	0,134	6 (42,9)	36 (56,3)	0,363	4 (30,8)	38 (58,5)	0,125	3 (60,0)	39 (53,4)	1,000
Aumento do volume abdominal, n (%)	0 (0,0)	8 (11,4)	0,591	1 (7,1)	7 (10,9)	1,000	1 (7,7)	7 (10,8)	1,000	0 (0,0)	8 (11,0)	1,000
Hepatomegalia (imagem), n (%)	2 (25,0)	24 (34,3)	0,712	5 (35,7)	21 (32,8)	1,000	4 (30,8)	22 (33,8)	1,000	2 (40,0)	24 (32,9)	1,000
Esplenomegalia (imagem), n (%)	2 (25,0)	22 (31,4)	1,000	6 (42,9)	18 (28,1)	0,342	4 (30,8)	20 (30,8)	1,000	3 (60,0)	21 (28,8)	0,166
Adenomegalia intrabdominal, n (%)	0 (0,0)	16 (22,9)	0,195	2 (14,3)	14 (21,9)	0,722	2 (15,4)	14 (21,5)	1,000	2 (40,0)	14 (19,2)	0,217
SNC alterações de imagem, n (%)	2 (25,0)	18 (25,7)	1,000	1 (7,1)	19 (29,7)	0,100	2 (15,4)	18 (27,7)	0,496	2 (40,0)	18 (24,7)	0,598
Abscessos no SNC, n (%)	2 (25,0)	0 (0,0)	0,103	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Meningite, n (%)	0 (0,0)	6 (8,6)	1,000	0 (0,0)	6 (9,4)	0,584	0 (0,0)	6 (9,2)	0,582	0 (0,0)	6 (8,2)	1,000
Verticilite, n (%)	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000

Dados clínico-laboratoriais e diagnósticos alternativos

Criptococose, n (%)	0 (0,0)	5 (7,1)	1,000	0 (0,0)	5 (7,8)	0,579	0 (0,0)	5 (7,7)	0,583	0 (0,0)	5 (6,8)	1,000
Tuberculose, n (%)	1 (12,5)	12 (17,1)	1,000	2 (14,3)	11 (17,2)	1,000	2 (15,4)	11 (16,9)	1,000	2 (40,0)	11 (15,1)	0,192
Bacteremia, n (%)	0 (0,0)	3 (4,3)	1,000	0 (0,0)	3 (4,7)	1,000	1 (7,7)	2 (3,1)	0,426	1 (20,0)	2 (2,7)	0,182
Exame micológico direto, n (%)	6 (75,0)	53 (75,7)	1,000	10 (71,4)	49 (76,6)	0,735	9 (69,2)	50 (76,9)	0,724	4 (80,0)	55 (75,3)	1,000
Exame micológico direto para <i>H. capsulatum</i> , n (%)	1 (12,5)	0 (0,0)	0,103	0 (0,0)	1 (1,6)	1,000	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000	0 (0,0)	1 (1,4)	1,000
Cultura (Solicitado), n (%)	6 (75,0)	55 (78,6)	1,000	10 (71,4)	51 (79,7)	0,491	10 (76,9)	51 (78,5)	1,000	5 (100,0)	56 (76,7)	0,580
Cultura Positiva para <i>H. capsulatum</i> , n (%)	6 (75,0)	0 (0,0)	0,000	5 (35,7)	1 (1,6)	0,001	5 (38,5)	1 (1,5)	0,000	0 (0,0)	6 (8,2)	1,000

Biopsia, n (%)	7 (87,5)	32 (45,7)	0,056	10 (71,4)	29 (45,3)	0,077	10 (76,9)	29 (44,6)	0,065	2 (40,0)	37 (50,7)	1,000
Biopsia evidenciando <i>H. capsulatum</i> , n (%)	6 (75,0)	0 (0,0)	0,000	7 (50,0)	0 (0,0)	0,000	7 (53,8)	0 (0,0)	0,000	1 (20,0)	6 (8,2)	0,383
Pancitopenia, n (%)	2 (25,0)	14 (20,0)	0,664	5 (35,7)	11 (17,2)	0,148	4 (30,8)	12 (18,5)	0,450	1 (20,0)	15 (20,5)	1,000
Proteína C reativa, mediana em mg/L (min-max)	54 (29-138)	53 (1-723)	0,656	54 (15-139)	53 (1-723)	0,993	56 (3-138)	53 (1-723)	0,942	22 (3-238)	54 (1-723)	0,387
Lactato desidrogenase, mediana em U/L (min-max)	359 (250-1.004)	375 (44-12.419)	0,833	363 (243-12.419)	336 (44-2.539)	0,392	363 (250-12.419)	336 (44-2.539)	0,503	1.341 (184-12.419)	361 (44-2.539)	0,456
Fosfatase alcalina, mediana em U/L (min-max)	100 (60-241)	132 (50-1205)	0,168	139 (60-489)	129 (50-1205)	0,483	114 (60-370)	130 (50-1205)	0,859	257 (82-400)	128 (50-1205)	0,305
Transaminase Glutâmico-Oxalacética, mediana em U/L (min-max)	30 (15-94)	49 (17-2118)	0,144	34 (15-150)	47 (17-2118)	0,489	42 (15-94)	45 (17-2118)	0,388	66 (21-187)	44 (15-2118)	0,652
Transaminase Glutâmico-Pirúvica, mediana em U/L (min-max)	20 (5-92)	41 (10-795)	0,074	26 (5-124)	43 (10-795)	0,106	28 (5-92)	41 (10-795)	0,120	51 (17-136)	39 (5-795)	0,809
Gama Glutamil Transferase, mediana em em U/L (min-max)	66 (52-227)	154 (12-1.839)	0,383	144 (23-445)	150 (12-1.839)	0,661	66 (23-293)	154 (12-1.939)	0,173	197 (23-787)	150 (12-1.839)	0,840
Hemoglobina, mediana em g/dl (min-max)	7,4 (5,0-9,8)	9,8 (5,6-14,3)	0,007	7,9 (5,0-12,4)	10,3 (6,0-14,3)	0,030	7,6 (5,0-13,0)	9,5 (6,0-14,3)	0,072	9,8 (5,6-13,2)	9,0 (5,0-14,3)	0,868
Plaquetas, média/mm ³ (sd)	253.142 (215.459)	235.415 (145284)	0,838	228.461 (172.021)	239.050 (148272)	0,840	267.500 (185.451)	231.067 (144.961)	0,531	296.600 (222.804)	232.701 (146.361)	0,560
Leucócitos, mediana/mm ³ (min-max)	4.690 (2.420-12.140)	5.330 (1.930-10.3945)	0,700	4.430 (2.160-7.950)	5.380 (1.930-10.3945)	0,172	4.250 (2.160-7.950)	5.440 (1.930-10.3945)	0,111	3.980 (2.400-13.430)	5.330 (1.930-10.3945)	0,445
Linfócitos, mediana/mm ³ (min-max)	643 (219-872)	823 (144-9.200)	0,079	621 (249-4.420)	830 (144-9.200)	0,080	644 (249-1.309)	830 (144-9.200)	0,123	927 (249-1.460)	794 (144-9.200)	0,955
Drogas antifúngicas (durante o estudo), n (%)	8 (100,0)	21 (30,0)	0,000	10 (71,4)	19 (29,7)	0,005	9 (69,2)	20 (30,8)	0,013	1 (20,0)	28 (38,4)	0,646
Sobreviveu, n (%)	5 (62,5)	56 (84,6)	0,323	10 (76,9)	51 (85,0)	0,438	9 (75,0)	52 (85,2)	0,403	5 (100,0)	56 (82,4)	0,583

Teste (método)

IMMY resultado, n (%)	8 (100,0)	5 (7,1)	0,000	11 (78,6)	2 (3,1)	0,000	-	-	2 (40,0)	11 (15,1)	0,192
CDC resultado, n (%)	8 (100,0)	6 (8,6)	0,000	-	-	-	11 (84,6)	3 (4,6)	1 (20,0)	13 (17,8)	1,000
Platelia™ resultado, n (%)	0 (0,0)	5 (7,1)	1,000	1 (7,1)	4 (6,3)	1,000	2 (15,4)	3 (4,6)	5 (100,0)	-	-

Legenda: CDC, Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, EUA); HIV, vírus da imunodeficiência humana; indet = indetectável; sd = desvio padrão; SNC, sistema nervoso central.