



Ministério da Educação

Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



**OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO TESTE DE  
ANTÍGENO URINÁRIO NA INVESTIGAÇÃO DE HISTOPLASMOSE  
EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE  
HIV/AIDS**

**Bianca dos Santos Blan**

Rio Grande, 2024



Ministério da Educação Universidade Federal do Rio Grande  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



**OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO TESTE DE  
ANTÍGENO URINÁRIO NA INVESTIGAÇÃO DE HISTOPLASMOSE  
EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE  
HIV/AIDS**

**Bianca dos Santos Blan**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Melissa  
Orzechowski Xavier

Rio Grande, 2024

## Ficha Catalográfica

B638o Blan, Bianca dos Santos.

Otimização e implementação sistemática do teste de antígeno urinário na investigação de histoplasmose em um hospital de referência no tratamento de HIV/AIDS / Bianca dos Santos Blan. – 2024.

57 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2024.

Orientadora: Dra. Melissa Orzechowski Xavier.

1. Vírus da imunodeficiência humana 2. Síndrome da imunodeficiência adquirida 3. Infecções oportunistas  
4. *Histoplasma* spp 5. Co-infecção I. Xavier, Melissa Orzechowski  
II. Título.

CDU 616.988

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

**Bianca dos Santos Blan**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO TESTE DE ANTÍGENO URINÁRIO NA INVESTIGAÇÃO DE HISTOPLASMOSE EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE HIV/AIDS**

**Banca Examinadora**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanusa Pousada da Hora– FURG

Prof. Dra. Jéssica Louise Benelli– Externo – UFCSPA

Prof. Dra. Rossana Patricia Basso (Suplente) – FURG

Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier – FURG (Orientadora)



ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA

A banca examinadora, designada pela Portaria nº 309/2024 de seis de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, em sessão presidida e registrada pela orientadora Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier, reuniu-se no dia vinte e nove de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, às nove horas, na sala 214, para avaliar a Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: "OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO SISTEMÁTICA DO TESTE DE ANTÍGENO URINÁRIO NA INVESTIGAÇÃO DE HISTOPLASMOSE EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE HIV/AIDS" da mestranda Bianca dos Santos Blan. Para o início dos trabalhos, a Senhora Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 30 (trinta) minutos para a apresentação da dissertação pelo mestrando, que iniciou às 9 horas e terminou às 9 horas e 45 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a dissertação de mestrado avaliada foi Aprovada.

Rio Grande, 29 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier (Orientadora – FURG)

Profa. Dra. Jéssica Louise Benelli (Externo – UFCSPA)

Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora (Titular – FURG)

Profa. Dra. Rossana Patricia Basso (Suplente - FURG)

Melissa Orzechowski Xavier  
Jéssica Louise Benelli  
Vanusa Pousada da Hora  
Rossana Patricia Basso

CIENTE: \_\_\_\_\_

Blan  
Mestranda Bianca dos Santos Blan

## RESUMO

A histoplasmose disseminada (HD), micose sistêmica ocasionada pelo *Histoplasma* spp., caracteriza-se como uma das principais infecções oportunistas (IO) em pessoas vivendo com HIV/aids (PVHA) sendo uma doença definidora de aids responsável por alta mortalidade. Embora seja uma IO frequente em PVHA em áreas endêmicas, trata-se de uma doença negligenciada e comumente confundida com a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Desde 2020, a OPAS/OMS recomenda a utilização do teste de biomarcador urinário como padrão-ouro no diagnóstico de HD em PVHA. Rio Grande enfrenta um cenário preocupante frente a prevalência de HIV/aids e de IO. Almejando diagnosticar precocemente a HD, desde março de 2021 foi implementado no HU-FURG/EBSERH de forma sistemática a realização do teste padrão-ouro que utiliza o Ensaio imunoenzimático com detecção de Galactomanana de *Histoplasma* spp. (HGM-EIA, IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) em todas as PVHA com LTCD4+ < 200 células/mm<sup>3</sup>, em abandono de tratamento ou com diagnóstico recente de HIV. Uma avaliação do cenário da HD após essa implementação do teste como *screening* para essa IO é de grande valia para comprovar sua eficácia e direcionar os grupos de maior risco de HD buscando a otimização do custo-benefício no local. O HGM-EIA implementado, permite a interpretação do resultado pela curva padrão - baseada em sete concentrações pré-definidas pelo fabricante, bem como a interpretação pelo calibrador, que utiliza apenas uma concentração de controle; esta última é almejada devido a um melhor rendimento do teste com possibilidade de redução nos custos. Porém, o ponto de corte definido pelo fabricante pode ser otimizado buscando minimizar falsos-negativos. Contudo, objetivou-se otimizar o teste HGM-EIA para diagnóstico de HD, e avaliar o impacto da implementação sistemática desse teste como rastreamento de HD em PVHA em um hospital terciário do Extremo Sul do Brasil. O estudo incluiu todas as PVHA com HD no período de março de 2021 a setembro de 2022, avaliando variáveis clínico-epidemiológicas, e avaliou a performance do teste utilizando distintos pontos de corte para interpretação dos resultados. Testes estatísticos foram realizados para a análise dos resultados, utilizando o programa SPSS 24.0 (IBM® SPSS *Statistics*), considerados valores de  $p < 0,05$  significativos. Os aspectos éticos foram respeitados (SEI nº 28/2022 e CEP-FURG nº 5.578.347). A otimização do HGM-EIA pelo calibrador permitiu definir o ponto de corte de 0,8 UEIA, a partir do qual obteve-se um aumento da sensibilidade do teste em 16%, com redução de apenas 1,25% na taxa de especificidade comparado ao ponto de corte do calibrador sugerido pelo fabricante, resultando em sensibilidade de 88% e especificidade de 98.7%. A prevalência de HD em PVHA foi de 9% (26/287), e resultou em um aumento em mais de 200% da taxa de diagnósticos desta IO e uma redução de 30% na taxa de mortalidade ao comparar esse resultado com o de estudos prévios (passando de 12 para 39 casos a cada 1.000 internações, e de 35% para 24% a taxa de mortalidade em 90 dias). O estudo pioneiro na otimização do HGM-EIA pelo calibrador, permitiu um melhor aproveitamento do teste, enquanto a sua implementação sistemática resultou em diagnósticos possivelmente precoces com melhor prognóstico, possibilitando tratamento por via oral sem necessidade de hospitalização, reduzindo casos graves de HD.

**Palavras-chave:** Vírus da imunodeficiência humana. Síndrome da imunodeficiência adquirida. Infecções oportunistas. *Histoplasma* spp. Co-infecção.

## ABSTRACT

Disseminated histoplasmosis (DH), a systemic mycosis caused by *Histoplasma* spp., is characterized as one of the main opportunistic infections (OI) in people living with HIV/aids (PLWHA) and is an aids-defining disease responsible for high mortality. Although it is a frequent OI in PLWHA in endemic areas, it is a neglected disease and is commonly confused with *Mycobacterium tuberculosis* infection. Since 2020, PAHO/WHO has recommended the use of the urinary biomarker test as the gold standard in the diagnosis of DH in PLWHA. Rio Grande faces a worrying scenario regarding the prevalence of HIV/aids and OI. Aiming to diagnose DH early, since March 2021, the gold standard test has been systematically implemented at HU-FURG/EBSERH using the enzyme immunoassay with detection of Galactomannan from *Histoplasma* spp. (HGM-EIA, IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) in all PLWHA with LTCD4+ < 200 cells/mm<sup>3</sup>, abandoning treatment or recently diagnosed with HIV. An assessment of the DH scenario after implementing the test as screening for this OI is of great value to prove its effectiveness and target groups at the highest risk of DH, seeking to optimize cost-benefit on-site. The implemented HGM-EIA determines the result using the standard curve based on seven control concentrations predefined by the manufacturer, but interpretation by the calibrator, which uses only one control concentration, is desired owing to better test performance. with the possibility of cost reduction. However, the cutoff point defined by the manufacturer excluded DH patients. The objective was to optimize the interpretation of the HGM-EIA by the calibrator for DH diagnosis and to evaluate the impact of the systematic implementation of this test for DH screening in PLWHA in a tertiary hospital in the Far South of Brazil. The study covered all PLWHA with DH from March 2021 to September 2022. Statistical analysis was performed using the SPSS 24.0 program (IBM® SPSS Statistics), considering  $p < 0.05$  values to be significant. Ethical aspects were respected (SEI n° 28/2022 and CEP-FURG n° 5,578,347). The optimization of the HGM-EIA by the calibrator allowed defining the cutoff point of 0.8 UEIA, from which an increase in test sensitivity of 16% was obtained, with a reduction of only 1.25% in the specificity rate compared to the calibrator cutoff point suggested by the manufacturer, resulting in sensitivity and specificity of 88% and 98.7%, respectively. The prevalence of DH in PLWHA was 9% (26/287), which resulted in an increase of more than 200% in the diagnosis rate of this OI and a 30% reduction in the mortality rate when comparing this result with that of previous studies (rising from 12 to 39 cases per 1,000 hospitalizations, and the 90-day mortality rate from 35% to 24%). The pioneering study in optimizing the HGM-EIA using the calibrator allowed for better use of the test, while its systematic implementation possibly resulted in early diagnoses with a better prognosis and oral treatment without the need for hospitalization, which impacted on the reduction severe cases of DH.

**Keywords:** Human immunodeficiency virus. Acquired immunodeficiency syndrome. Opportunistic infections. *Histoplasma* spp. Coinfection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ARV	Antirretroviral
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FC	Fixação do complemento
HD	Histoplasmose disseminada
HGM-EIA	Ensaio imunoenzimático de Galactomanana de <i>Histoplasma</i> spp
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão dupla em gel de ágar
IO	Infecções oportunistas
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PVHA	Pessoas vivendo com HIV/ aids
RS	Rio Grande do Sul
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UEIA	Unidades de Ensaio imunoenzimático



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1 Definição e Taxonomia .....	10
2.2 Histórico .....	10
2.3 Ecologia e aspectos morfológicos de <i>Histoplasma</i> spp.....	12
2.4 Fisiopatologia da histoplasmose .....	13
2.5 Formas Clínicas .....	14
2.5.1 Histoplasmose pulmonar aguda.....	14
2.5.2 Histoplasmose pulmonar crônica .....	15
2.5.3 Histoplasmose disseminada.....	15
2.6 Epidemiologia da histoplasmose disseminada .....	16
2.7 Métodos diagnósticos .....	17
2.7.1 Microscopia direta .....	17
2.7.2 Cultivo Fúngico .....	18
2.7.3 Histopatologia .....	18
2.7.4 Imunodiagnóstico .....	19
2.7.5 Biologia Molecular .....	20
2.8 Tratamento da histoplasmose .....	21
2.9 Coinfecção histoplasmose e tuberculose .....	21
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	25
4.1 Objetivo Geral .....	25
4.2 Objetivos Específicos .....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	26
5.1 Artigo 1... ..	26
5.2 Manuscrito 2 .....	30
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
<b>ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA</b> .....	51
<b>ANEXO B- PARECER COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma doença fúngica sistêmica ocasionada por fungo dimórfico do gênero *Histoplasma*. A infecção é adquirida pela inalação dos microconídios da fase filamentosa presente no ambiente, especialmente em locais com solo rico em nitrogênio, contendo acúmulo de fezes de morcegos e/ou excretas de aves. O processo fisiopatológico ocorre no parênquima alveolar com o dimorfismo fúngico para a fase leveduriforme ativando a resposta imunológica do hospedeiro (LACAZ et al., 2002; BRASIL, 2018).

A histoplasmose pode ser classificada em pulmonar aguda, pulmonar crônica e disseminada, tendo sua via patogênica por infecção primária ou por reativação endógena, culminando com manifestações clínicas de acordo com a capacidade imunológica do hospedeiro. A histoplasmose disseminada (HD) é a apresentação clínica mais grave dessa micose e está relacionada à imunodepressão do indivíduo, sendo uma doença definidora de aids e uma das principais infecções oportunistas (IO) em pessoas vivendo com vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida (PVHA) em áreas endêmicas (WHEAT; SLAMA; ZECKEL, 1985; FALCI; DALLA LANA; PASQUALOTTO, 2021).

A prevalência da histoplasmose na América Latina é de 32%, variando entre 0,1% no Chile e 57% na Guatemala, com uma estimativa de incidência anual de 1,48 casos a cada 100 PVHA abrangendo mais de 22.000 casos ao ano. No Brasil a prevalência registrada é de 20% com uma incidência anual estimada de 0,79 casos a cada 100 PVHA totalizando cerca de 5.000 casos ao ano. No entanto esses números são provavelmente subestimados, considerando que a HD não é uma doença de notificação compulsória e ainda é comumente confundida com a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (ADENIS et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019).

Adenis et al. (2018) demonstrou que na América Latina, no ano de 2012, a incidência da tuberculose (TB) e da histoplasmose em PVHA eram semelhantes, no entanto quando comparada a taxa de mortalidade, essa foi maior na histoplasmose. Diante disso, estima-se que a ocorrência de histoplasmose, atualmente ultrapasse a da TB na América Latina, considerando as fragilidades na suspeição e nos recursos diagnósticos (PASQUALOTTO e QUEIROZ-TELLES, 2019). Em adição, a HD em PVHA no Brasil é associada a uma taxa de mortalidade entre 30 e 35% (ALMEIDA et al., 2019; BASSO et al., 2022).

Para o diagnóstico da histoplasmose são necessários exames laboratoriais, como exames micológicos clássicos (cultivo fúngico e exame micológico direto), testes de imunodiagnóstico e/ou histopatologia. Os exames micológicos clássicos e a histopatologia podem confirmar o

diagnóstico de histoplasmose pela detecção direta do agente etiológico a partir da visualização de estruturas fúngicas de parasitismo em amostras biológicas, ou pelo isolamento de colônias fúngicas de *Histoplasma* spp. em meios de cultivo apropriados. No entanto, esses métodos não permitem um diagnóstico precoce e apresentam baixa sensibilidade (CÁCERES et al., 2019a). Contudo, desde 2020 a OPAS/OMS recomenda a utilização do teste de detecção de biomarcador urinário (galactomanana de *Histoplasma* spp.) como primeira escolha para o diagnóstico da HD entre as PVHA. Diante do fato de utilizar uma amostra clínica de fácil obtenção e permitir a liberação de um resultado em menor tempo, essa recomendação visa otimizar o diagnóstico, permitindo um tratamento precoce e uma consequente redução da mortalidade (CÁCERES et al., 2019a; FALCI et al., 2019).

Ainda que seja de difícil acesso devido ao alto custo, encontra-se comercialmente disponível kit de ensaio imunoenzimático (EIA) que detecta quantitativamente o antígeno galactomanana (GM) de *Histoplasma* spp. em amostras de urina (DANTAS et al., 2018). Trata-se de um método diagnóstico recente contemplado na lista de exames diagnósticos essenciais da OMS desde o ano de 2019 (OMS, 2019). No entanto, esse teste ainda não é disponibilizado gratuitamente para pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS), estando restrito a poucos hospitais do Brasil. O Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Côrrea Jr. da Universidade Federal do Rio Grande (HU-FURG/EBSERH) foi um dos primeiros hospitais 100% SUS do país a implementar o teste IMMY's Clarus® *Histoplasma* GM EIA (HGM-EIA. IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) para investigação sistemática de HD em todas PVHA atendidos desde março de 2021. Essa implementação foi justificada pela alta incidência local da doença detectada em estudo prévio, a qual foi associada a uma taxa de 35% de mortalidade das PVHA atendidos no HU-FURG/EBSERH (BASSO et al., 2022).

Considerando que a precocidade diagnóstica está diretamente relacionada a um melhor prognóstico do paciente com HD (CÁCERES et al., 2019A) faz-se necessário novos estudos avaliando dados clínicos-epidemiológicos de PVHA em locais que utilizam o teste para detecção de GM de *Histoplasma* spp. como teste de rastreio dessa micose oportunista para todos os pacientes assistidos, no intuito de avaliar o impacto dessa estratégia no prognóstico do paciente e consequentemente na redução da mortalidade.

O kit comercial IMMY's Clarus® *Histoplasma* GM EIA baseia-se no método de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), cuja interpretação dos resultados recomendada pelo fabricante pode ser realizada de dois métodos (pela curva padrão ou pelo ponto de corte baseado no calibrador), sendo a mais robusta interpretação a fundamentada no cálculo realizado com os

valores de uma curva padrão traçada por sete concentrações do antígeno fornecidas pelo fabricante junto ao kit (padrões), para a qual o resultado quantitativo é descrito em ng/mL. Essa curva padrão, garante a confiabilidade dos resultados obtidos durante a realização do teste. Por outro lado, há a possibilidade de interpretação dos resultados pelo procedimento de ponto de corte baseado no “calibrador” (utilizando apenas um padrão) com resultado semiquantitativo o qual é determinado em unidades de ensaio imunoenzimático (UEIA), que implica um melhor rendimento do teste, uma vez que utiliza menos poços da microplaca para o controle, permitindo maior número de amostras analisadas por kit, e conseqüente redução de custos. A interpretação por este último método permite incrementar o número de amostras clínicas testadas a cada kit em 43%, associado a uma redução de 30% no custo de cada PVHA investigada para HD Tendo em vista o impacto da redução de custos na assistência à saúde, em especial tratando-se do SUS, estudos que comprovem a robustez dos resultados do teste HGM-EIA utilizando a interpretação pelo calibrador são de grande valia, auxiliando a viabilizar sua aplicabilidade na rotina diagnóstica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Definição e taxonomia

A histoplasmose é uma micose que atinge humanos e animais, causada pelo fungo dimórfico e geofílico *Histoplasma* spp., o qual pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Subfilo *Ascomytina*, Classe *Ascomycetes*, Ordem *Onygenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Histoplasma* (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 1990; FOCACCIA, 2021). Em 2017, após estudos de análises filogenéticas do genoma total de isolados de *Histoplasma* spp., o gênero foi reclassificado em quatro espécies: *Histoplasma mississippiense* (anteriormente NAm1), *Histoplasma ohiense* (anteriormente NAm2), *Histoplasma suramericanum* (anteriormente LAm A) e *Histoplasma capsulatum* sensu strictu (anteriormente Panamá) (SEPÚLVEDA et al., 2017).

### 2.2 Histórico

O primeiro relato de histoplasmose ocorreu no Panamá, em 1905 pelo patologista norte-americano, Samuel Taylor Darling, que estava à serviço no Hospital de Ancon, durante a necrópsia de um homem de 27 anos, nativo da Martinica que faleceu em função de doença febril, cuja causa havia sido inicialmente atribuída à tuberculose miliar. O nome *Histoplasma capsulatum* surgiu após Darling observar as lesões teciduais e aspectos microscópicos, e sugerir se tratar de um novo protozoário intracelular, devido a invasão do citoplasma dos histiócitos por numerosas estruturas que pareciam ser encapsuladas (HAGAN, 2003).

Até 1908, Darling observou mais dois óbitos com manifestações clínicas semelhantes, os três casos apresentavam esplenomegalia, febre, leucopenia e anemia, sendo possível verificar a invasão pelo *H. capsulatum* de células epiteliais e de vasos sanguíneos, bem como lesões hepáticas, pulmonares, intestinais e em linfonodos (DARLING, 1909). Em 1912, Henrique Rocha Lima, microbiologista e patologista brasileiro, comparou amostras de seus pacientes com leishmaniose com as obtidas por Darling, e pode constatar que o *H. capsulatum* apresentava estruturas mais semelhantes aos fungos do que aos protozoários (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 1990; HAGAN, 2003).

A natureza de sua identificação dimórfica ocorreu em 1934, após William Demonbreun diagnosticar o primeiro caso da doença em um paciente vivo. Demonbreun isolou o fungo em um meio de cultura, observando seu crescimento em temperatura ambiente e a 37°C em que verificou a presença de aspectos filamentosos e leveduriformes (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 1990; FOCACCIA, 2021). Já em 1939, foi descrito pela primeira vez no Brasil a presença

de *Histoplasma* spp. no cultivo de uma biópsia de provável caso de cromomicose (ALMEIDA; LACAZ, 1939). A primeira coinfeção histoplasmose e TB foi relatada em 1941 após o isolamento do fungo em amostra respiratória (WANKE; LAZERA, 2004). No mesmo ano, ocorreu o primeiro óbito por HD descrito no Brasil (LACAZ et al., 2002).

Em 1948, houve o isolamento do *Histoplasma* spp. em amostras do solo de um galinheiro, e 10 anos depois foi reconhecida a importância da presença de fezes de morcego no processo de disseminação do fungo (EMMONS, 1958). A HD era descrita em pessoas que faziam uso de imunossupressores e/ou apresentavam condições de imunossupressão como linfomas, e outras condições não definidas. A partir da epidemia de aids, na década de 1980, a HD passou a ser relatada como uma das principais infecções oportunistas em pessoas com aids (WHEAT; SLAMA; ZECKEL, 1985). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 1987, passou a caracterizar a histoplasmose extrapulmonar como critério de definição de aids em PVHA (CDC, 1987).

No ano de 2017, com a conclusão da análise do genoma total de isolados de *Histoplasma* spp. e reclassificação do gênero em quatro espécies, foi identificado que espécies apresentam diferenças tanto pela distribuição geográfica, quanto por características relacionadas a fatores de virulência, ocorrência de manifestação clínica pulmonar e taxa de mortalidade associada. O *H. capsulatum* tem sua distribuição restrita ao Panamá, enquanto o *H. mississippiense*, é encontrado na América do Norte, apresentando maior prevalência no Vale do Mississipi. Essa espécie manifesta uma atividade proteolítica extracelular e embora seja menos virulenta apresenta uma alta taxa de resistência aos antifúngicos de eleição para o tratamento da histoplasmose. *H. ohioense*, também é encontrado na América do Norte, porém na região do Vale do Ohio; sua característica principal é a ausência de  $\alpha$ -(1,3)-glucano em sua parede celular, favorecendo sua virulência. *H. suramericanum* é descrito na América Latina, está associado a presença de manifestações pulmonares mais graves e registra altas taxas de mortalidade (SEPÚLVEDA et al., 2017). Estudo de Almeida-Silva et al. (2021) destaca a importância da genotipagem em isolados de *Histoplasma* spp. e sugere uma melhor compreensão da espécie *H. suramericanum* diante da observação de padrões genéticos distintos entre isolados provenientes da Colômbia, Rio de Janeiro e do Nordeste do Brasil, propondo uma caracterização de sintomatologia entre as linhagens.

No ano de 2019 em Manaus, o evento “*The II Regional Meeting on Histoplasmosis in the Americas*” reuniu especialistas de renome de diversos países e gestores de saúde, tendo como desfecho a elaboração do documento que deu origem ao *Guideline* que contempla as

diretrizes para o diagnóstico e tratamento da HD entre PVHA. Este documento oficial recomendou, entre outras vertentes, a implementação do teste de detecção de antígeno urinário para o diagnóstico de HD na rotina laboratorial (CÁCERES et al., 2019b; OPAS/OMS, 2020). Após alguns anos, durante o evento “*Brazilian Histoplasmosis Meeting*” ocorrido em 2022 na cidade de Porto Alegre- RS, novamente especialistas e gestores em saúde ao avaliar a problemática da histoplasmose em PVHA no Brasil culminando na alta incidência, morbidade e mortalidade, evidenciaram seu impacto na saúde pública, e de forma consensual foi elaborado um novo documento técnico-científico recomendando o acesso ao método diagnóstico de detecção de antígeno urinário, e a um tratamento com fármaco de menor toxicidade (anfotericina B lipossomal), permitindo além da precocidade diagnóstica, maiores taxas de cura e consequente redução na mortalidade (PASQUALOTTO et al., 2023).

### **2.3 Ecologia, biologia e aspectos morfológicos do *Histoplasma* spp.**

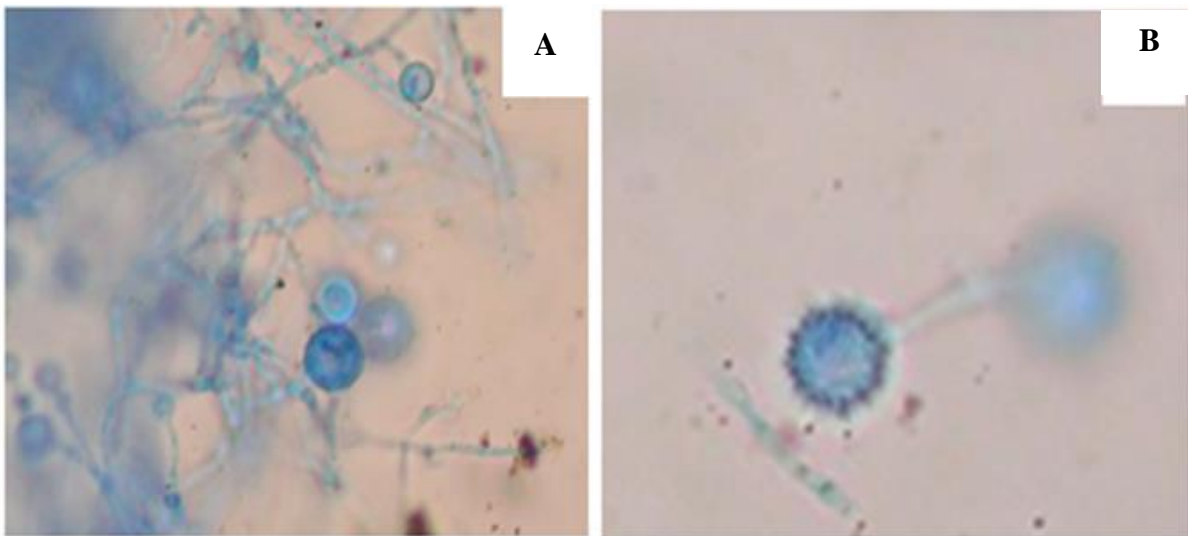
*Histoplasma* spp. apresenta uma correlação direta com os fatores ambientais, necessitando de condições propícias para a sua proliferação no solo, que incluem principalmente um pH ácido, presença de umidade, temperatura anual média entre 22 e 29°C, pouca profundidade (cerca de 15 a 20 cm da superfície) e fontes de nitrogênio oriundas principalmente de excretas de galinhas e/ou fezes de morcegos (KAUFFMAN, 2007; CORREIA, 2012). Por trata-se de um fungo de dimorfismo térmico, tem duas formas de apresentação dependentes da temperatura, sendo filamentosos quando em temperaturas inferiores a 35°C, e leveduriforme quando exposto a temperaturas iguais e superiores a 37°C (FOCACCIA, 2021).

A fase filamentosa, a qual o fungo encontra-se no solo em seu estado saprofítico, configura-se o estado infectante do *Histoplasma* spp. Nesta fase o fungo apresenta hifas hialinas, finas, septadas e ramificadas, além de dois tipos de conídios: microconídios e macroconídios. Os microconídios são ovalados, diâmetro de 2 a 5 µm, parede celular lisa, sendo reconhecidos como propágulos infectantes tendo em vista que em função de seu tamanho são capazes de alcançar a via área inferior do hospedeiro. Já os macroconídios apresentam forma esférica a piriforme, diâmetro de 8 a 15 µm, parede celular espessa, sem septos, podendo ter múltiplas protruções na superfície conferindo um aspecto tuberculado, localizados nas extremidades dos conidióforos (Figura 1) (FOCACCIA, 2021).

Ao atingir o organismo do hospedeiro, em decorrência da temperatura corporal, ocorre o dimorfismo fúngico, para a fase leveduriforme acarretando o estado de parasitismo. Apresenta-

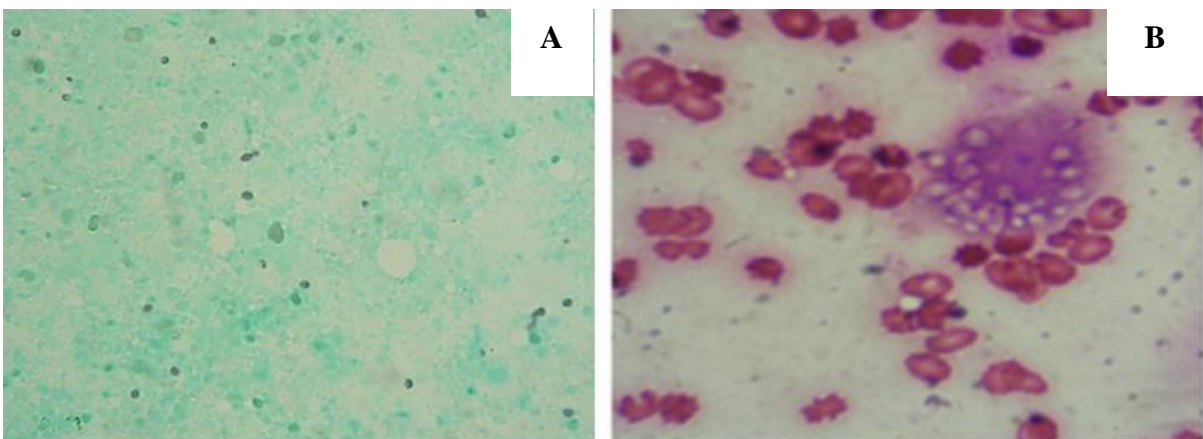
se sob forma de blastoconídios ovais, unibrotantes, uninucleadas, com 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e parede celular intermediária (Figura 2) (FOCACCIA, 2021; WOODS, 2003). Apesar de não possuir cápsula, na microscopia a visualização do fungo nesta fase apresenta um halo ao seu redor, justificado pela ausência de pigmentação da parede celular pelo corante (FERREIRA; BORGES, 2009).

**FIGURA 1 - *Histoplasma* spp. (Fase filamentosa), microscopia evidenciando microconídios e macroconídios característicos (Aumento de 40X).**



Fonte: Imagens do arquivo do Laboratório de Micologia FAMED-FURG

**FIGURA 2 - *Histoplasma* spp. (Fase leveduriforme). (A) Microscopia da fase leveduriforme com blastoconídios pequenos, ovalados e unibrotantes corados pela prata e (B) Microscopia da fase leveduriforme com blastoconídios pequenos, ovalados e unibrotantes corados pela Giemsa (Aumento de 40X)**



Fonte: Imagens do arquivo do Laboratório de Micologia FAMED-FURG



Estudos demonstram que a parede celular do *Histoplasma* spp. é composta principalmente por  $\alpha$  (1,3) -glucana,  $\beta$ -glucanas, quitina e galactomanana (RAPPEYE; EISSENER; GOLDMAN, 2007). A galactomanana localiza-se na camada mais externa da parede celular dos principais fungos de importância médica, e, embora presente em pouca quantidade é o principal polissacarídeo da estrutura antigênica do fungo, sendo útil para desenvolvimento de diversos testes de imunodiagnóstico (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 2011; RIVIÈRE et al., 2012). Esse polissacarídeo é liberado no organismo durante o crescimento fúngico conforme ocorre a invasão dos tecidos, devido a sua característica hidrossolúvel é possível encontrá-lo em diferentes espécimes clínicas como urina, lavado broncoalveolar e líquido.

## 2.4 Fisiopatologia da histoplasmose

Após a inalação de microconídios, o fungo sofre termodimorfismo, transformando-se da fase filamentosa para a leveduriforme. O processo infeccioso se inicia nos alvéolos pulmonares, onde as células leveduriformes são fagocitadas, desencadeando uma resposta inflamatória. Os fagócitos migrados formam um complexo primário pulmonar, disseminando-se via hematogênica para órgãos como fígado e baço. Duas a três semanas após a infecção, ocorre a ativação da imunidade celular, na qual linfócitos T e macrófagos secretam Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), promovendo a fagocitose e destruição das leveduras. Isso leva à formação de granulomas, seguida por necrose, encapsulamento e depósito de sais de cálcio nas lesões (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 1990; KAUFFMAN, 2009).

*Histoplasma* spp. com seus fatores de virulência torna-se um importante patógeno no contexto de saúde pública, pois é capaz de desenvolver diferentes mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Além do dimorfismo térmico, o fungo é capaz de proliferar-se no interior dos fagolisossomos, bem como permanecer viável, sem comprometimento ao hospedeiro, por anos no interior dos granulomas até que uma fragilidade imunológica propicie sua reativação endógena, fato que justifica a ocorrência de HD em PVHA em áreas não endêmicas. Outros fatores, incluem a expressão de genes específicos, a modulação do pH, a utilização de ferro e cálcio como substrato para sua sobrevivência intracelular e a produção de melanina para proteção ao estresse oxidativo e aumento da resistência aos antifúngicos (FOCACCIA, 2021).

A quantidade de inóculo inalado e a integridade da resposta imunológica do hospedeiro são os principais determinantes da ocorrência e da gravidade da histoplasmose, que pode ser

assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica ou disseminada (FERNÁNDEZ ANDREU et al., 1990; GÓMEZ, 2011). Em pessoas imunocomprometidas *Histoplasma* spp. pode disseminar-se por via hematogênica, que sem diagnóstico e tratamento adequados pode evoluir ao óbito (NACHER, et al., 2020). Estima-se que mundialmente sejam registrados de 1,1 a 6,7 mil óbitos por ano decorrentes das diferentes apresentações clínicas da histoplasmose, sendo que as taxas mundiais de mortalidade para a doença podem variar de 10 a 60% (CÁCERES et al., 2012; ADENIS et al., 2018; NACHER et al., 2019).

## **2.5 Formas Clínicas**

As manifestações clínicas da histoplasmose podem ser inespecíficas, sendo facilmente confundida com outras doenças infecciosas, como a TB, interferindo no diagnóstico, tratamento e prognóstico do paciente (OPAS/OMS, 2020). Na América Latina registrou-se 57% de óbitos relacionados a histoplasmose, enquanto para a TB, a taxa foi de 43% (ADENIS et al, 2018). Estima-se que a ocorrência de histoplasmose atualmente ultrapasse o número de diagnósticos de TB na América Latina, porém fragilidades nos critérios de suspeição clínica da histoplasmose e no acesso aos recursos diagnósticos, resultam em subdiagnóstico da IO (ALMEIDA et al., 2019; PASQUALOTTO; QUEIROZ-TELLES, 2019).

A apresentação da sintomatologia depende da intensidade da exposição ao inóculo associada à resposta imunológica do hospedeiro. Na exposição de pequenas quantidades de inóculo, pessoas imunocompetentes podem ser assintomáticas, e isso ocorre em até 99% dos casos, ou então, podem apresentar histoplasmose pulmonar autolimitada. Por sua vez, pessoas imunocomprometidas tendem a desenvolver quadros mais graves da doença (GOMEZ, 2011; WHEAT et al., 2016).

### **2.5.1 Histoplasmose pulmonar aguda**

Ocorre principalmente em áreas com grande endemicidade, após a inalação maciça de propágulos fúngicos infectantes após exposição a uma fonte de infecção específica, comumente conhecida como “doença das cavernas”. É uma infecção primária geralmente autolimitada, cuja formação de granulomas contém o crescimento do fungo. Tem início súbito e suas manifestações clínicas mais comuns são: febre elevada, cefaleia, tosse seca, dor torácica, astenia, podendo ou não apresentar hepatoesplenomegalia e/ou adenomegalias superficiais. O período de incubação varia de uma a três semanas, cursando inicialmente com sintomas respiratórios semelhantes aos da gripe, podendo ocasionar manifestações agudas graves,

podendo desenvolver infiltrados pulmonares fibróticos apicais, crônicos e cavitações. Geralmente tem cura espontânea, mas em casos específicos existe a necessidade de tratamento adequado, os quadros de reinfecção costumam ser mais agudos (KAUFFMAN, 2009).

### **2.5.2 Histoplasmose pulmonar crônica**

É comum principalmente em pessoas com idade superior a 50 anos, tabagistas e/ou com doença pulmonar obstrutiva crônica pré-existente. O paciente pode demorar a perceber a sintomatologia apresentada uma vez que a tosse já se faz presente em sua vida pela patologia de base; quando não tratada apresenta um desfecho de até 80% de óbitos. As manifestações clínicas mais comuns são: febre baixa, tosse produtiva, dor torácica, dispneia, astenia, sudorese noturna e emagrecimento. As lesões pulmonares ocorrem principalmente nos ápices e geram lentamente fibrocavitações, que podem calcificar e são frequentemente confundidas com tuberculose (FERREIRA; BORGES, 2009; KAUFFMAN, 2009).

### **2.5.3 Histoplasmose disseminada**

É a disseminação hematogênica do *Histoplasma* spp., acometendo áreas extrapulmonares e extraganglionar mediastínicos de curso progressivo, atingindo o tegumento, linfonodos, fígado, baço, rins, glândulas suprarrenais e/ou olhos, com uveíte ou panofalmitite (SILVA et al., 2019). O desenvolvimento dessa forma ocorre, principalmente, pela reativação de infecção latente, mas a infecção de origem primária pode estar presente, quando houver exposição a uma grande quantidade de inóculo em áreas endêmicas. Acomete pessoas imunocomprometidas, como as PVHA, pessoas transplantadas, pessoas com neoplasias hematológicas, pessoas em uso de medicações imunossupressoras ou crianças menores de 6 meses de idade (KAUFFMAN, 2007; ROSSINI; GOULART, 2006).

Os sinais e sintomas podem variar, podendo ser inespecíficos, observa-se: febre persistente, sudorese noturna, inapetência, emagrecimento, tosse, dor torácica, dispneia, astenia, diarreia, lesões muco-cutâneas, hepatoesplenomegalia e/ou adenomegalias (AIDÉ, 2009). Cerca de 10% das pessoas com HD evoluem para choque e falência de múltiplos órgãos (CDC, 2020). Dentre os achados laboratoriais pode-se perceber pancitopenia, altos níveis de lactato desidrogenase, aumento de proteína C reativa e transaminases. Exames de imagem do tórax podem evidenciar infiltrado reticulonodular difuso bilateral e linfonodos mediastinais aumentados (ADENIS; AZNAR; COUPPIÉ, 2014).

## 2.6 Epidemiologia da HD

Existem relatos da doença ao longo de todo o mundo, sendo considerada endêmica na América do Norte nas regiões do Vale do Ohio e no Vale do Mississippi e em grande parte da América Latina (COUPPIÉ et al., 2006). No Brasil, casos de histoplasmose têm sido descritos em todo o país, principalmente das regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul (GUIMARÃES et al., 2006; FALCI et al., 2019; BASSO et al., 2022).

Na América do Norte o tempo necessário para diagnosticar a doença é de 2 a 5 dias utilizando método de imunodiagnóstico, associado a uma taxa de mortalidade média de 10%, enquanto na América Latina o tempo médio é de 14 a 21 dias utilizando o cultivo fúngico, registrando taxas de mortalidade em torno de 40% (PASQUALOTTO; QUIEROZ-TELLES, 2018). O Brasil é o maior país da América Latina, possui mais de 200 milhões de habitantes e o número de PVHA ultrapassa 1 milhão (TRAEBERT et al., 2018). Mesmo assim, a frequência de HD ainda não é bem definida, justificado pelo fato de ainda não ser uma doença de notificação compulsória, acarretando déficits no cenário de saúde pública, uma vez que sua prevalência e impactos na população são desconhecidos (NACHER et al., 2013).

O estado de Goiás realiza notificações dos casos de histoplasmose desde 2013, conforme resolução publicada pela Secretaria de Saúde do Estado de Goiás (Goiás, 2013), em que é determinado que as micoses endêmicas no estado sejam notificadas, independentemente de sua correlação ao HIV/aids. Tal fato, permite compreender os efeitos da histoplasmose no estado, bem como permitir ações no contexto de saúde pública que venham auxiliar na prevenção, controle, tratamento e diagnóstico adequado da população compreendida. O Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad em Goiânia-GO registrou 41% de prevalência de histoplasmose em PVHA, abrangendo pacientes com residência nos municípios de Goiânia e Aparecida de Goiânia, associado a uma mortalidade de 53% (FERREIRA, 2015).

Estudo de Guerra et al. (2020) evidenciou que desde o primeiro registro da doença no Brasil em 1946, até 2017, houve 40 surtos e microepidemias de histoplasmose aguda descritos na literatura pelo país, afetando 370 pessoas, sendo a maioria do sexo masculino, e proveniente do estado do Rio de Janeiro. Quanto a fonte de infecção, visitas em cavernas foram responsáveis por mais de 50% dos casos de histoplasmose, sendo que em 10% dos registros estavam relacionados ao manejo de galinheiros, a HD ocorreu em 13 pessoas (GUERRA et al., 2020).

Estudo de Falci et al. (2019) encontrou no Brasil uma prevalência para HD em PVHA sob hospitalização de 21,6% no período de 2016 a 2018. Sendo que na região Nordeste do país

foi encontrada uma taxa média de prevalência de 42,1%, sendo o município de Natal o maior índice. Na região centro-oeste o único município investigado foi o de Goiânia responsável por uma prevalência de 39,1%. No Sudeste a prevalência foi de apenas 8,8%, referente a cidade de São Paulo. No estado do Rio Grande do Sul a prevalência média registrada foi de 22,6%, sendo Santa Maria responsável pela maior prevalência do estado com 50% e Porto Alegre registrou a menor prevalência encontrada de 8,6% tanto no estado quanto no Brasil.

Falci et al. (2019) demonstrou também em seu estudo, considerado o maior estudo brasileiro sobre HD, que a taxa de mortalidade até 30 dias após o diagnóstico de HD, para pacientes diagnosticados por métodos micológicos clássicos foi de 26,9%, enquanto para pacientes diagnosticados pelo método de detecção de antígeno urinário a taxa foi de 14,3%. Ressalta-se que tais dados se referem a pacientes febris internados com HIV/aids, em que muitos apresentavam contagens de CD4+ inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>.

No município do Rio Grande, Basso et al. (2022) investigou a HD em PVHA sob internação hospitalar no período entre 2010 e 2019, obtendo uma incidência total de 12 casos/1.000 hospitalizações, porém entre 2010 e 2016, a incidência registrada foi de 8 casos/1.000 hospitalizações, enquanto entre 2017 e 2019 a taxa triplicou para 24 casos/1.000 hospitalizações. Pode-se perceber que entre os períodos houve um incremento de 300% no diagnóstico de HD, justificado pela implementação do teste de detecção do antígeno urinário, capacitação com profissionais de saúde realizando divulgação das manifestações clínicas da infecção fúngica, ressaltando sua importância no contexto de saúde pública e incentivando a suspeição clínica dessa. A taxa de mortalidade estabelecida no estudo foi de 35%.

## **2.7 Métodos diagnósticos**

O diagnóstico de histoplasmose é fundamentado em uma abordagem integral associando dados clínicos, história de saúde pregressa, informações demográficas, exames micológicos clássicos, imunodiagnósticos, correlação com exames de imagem do tórax e/ou histopatologia. Ressalta-se que método diagnóstico considerado como padrão-ouro na PVHA inclui tanto o cultivo fúngico quanto a utilização da detecção de antígenos, demais métodos atuam em caráter complementar (AZAR; HAGE, 2017; KAUFFMAN, 2009).

### **2.7.1 Microscopia direta**

É uma das técnicas utilizadas na rotina clínica laboratorial, porém, apesar do baixo custo apresenta sensibilidade e especificidade baixas na detecção e identificação do gênero

*Histoplasma*, diante da sua semelhança micromorfológica com outros fungos. Quando realizado, costuma-se utilizar as colorações de metenamina de prata de *Grocott-Gomori* ou *Giemsa*, sendo possível observar blastoconídios ovais e unbrotantes intracelulares. Em PVHA e com HD, aproximadamente 50% das amostras de aspirado de medula óssea são positivas, no entanto há necessidade de procedimento invasivo para coleta dessa amostra (AZAR; HAGE, 2017; KAUFFMAN, 2009).

### 2.7.2 Cultivo fúngico

O isolamento do fungo de amostras clínicas em meios de cultivo é considerado um dos métodos padrão-ouro no diagnóstico de histoplasmose. No entanto, *Histoplasma* spp. pode levar até seis semanas para crescimento, o que interfere no prognóstico do paciente, levando em consideração que casos mais graves exigem uma precocidade diagnóstica e terapêutica. A especificidade do método é de 100%, conforme a amostra biológica utilizada e forma clínica da doença, e pode apresentar uma sensibilidade média de 77%. Amostras de aspirado de medula óssea para diagnóstico de HD, podem demonstrar sensibilidade de até 90%, no entanto são de difícil obtenção (ADENIS; AZNAR; COUPPIÉ, 2014; KAUFFMAN, 2007).

As amostras biológicas são semeadas em ágar *Sabouraud* com ciclohexamida e são incubadas a uma temperatura de 25°C permitindo o desenvolvimento fúngico na fase filamentosa. Para a confirmação diagnóstica, se faz necessário a transformação do fungo para a fase leveduriforme, incubando-o em uma temperatura de 37°C, na qual a colônia de *Histoplasma* spp. apresenta uma coloração branca a marrom, textura lisa e cremosa (FERREIRA; BORGES, 2009; FOCACCIA, 2021; WANKE; LAZÉRA, 2004).

### 2.7.3 Histopatologia

A biópsia de um tecido fornece um diagnóstico presuntivo de histoplasmose a partir da sua avaliação com corantes específicos como ácido periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata de *Grocott-Gomori*, em que é possível identificar nos cortes histológicos a presença de leveduras pequenas, ovaladas e em brotamento único, com diâmetro de 2 a 4 µm que são sugestivas de *Histoplasma* spp. Na fase crônica, em pessoas imunocompetentes é possível a visualização destas estruturas fúngicas no interior de granulomas, que com o passar do tempo podem calcificar. Em imunocomprometidos pode-se observar a má formação de granulomas com elementos leveduriformes no meio intra e extracelular (FOCACCIA, 2021; KAUFFMAN,

2007). É um exame complementar no diagnóstico de histoplasmose, devendo estar associado a um exame padrão-ouro.

#### 2.7.4 Imunodiagnóstico

Os imunodiagnósticos são testes que detectam anticorpos e antígenos e ofertam um resultado mais rápido comparado a outros métodos. As principais técnicas empregadas para detecção de anticorpos na rotina diagnóstica, são a imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA) e a reação da fixação do complemento (FC). Estas técnicas são indicadas para diagnóstico da histoplasmose aguda e crônica. Na IDGA ocorre a detecção de anticorpos anti-M e anti-H que são produzidos após reação com estruturas antigênicas M e H de *Histoplasma* spp. Se houver presença desses anticorpos na amostra clínica, haverá a precipitação em forma de linha, que corresponde ao complexo antígeno-anticorpo (WHEAT, 1989). Entre 4 e 6 semanas do início das manifestações clínicas, o sistema imunológico do hospedeiro passa a produzir imunoglobulinas IgM, sendo possível a realização do IDGA a partir desse período. Ressalta-se que esse método diagnóstico não é recomendado para imunocomprometidos, uma vez que seu organismo possui a reatividade imunológica comprometida, não produzindo anticorpos em quantidades suficientes para sua detecção, podendo ocorrer assim, falsos-negativos (HAGE et al., 2015; WHEAT et al., 2016).

A reação de FC é mais sensível que a IDGA, com taxas de 70 a 90%, porém, possui especificidade de 70 a 80% (GUIMARÃES et al., 2006). Embora seja mais sensível que a IDGA, é possível que ocorra reação cruzada com *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides* spp. (GUIMARÃES et al., 2006). Nesse método os resultados são interpretados em forma de titulação, quanto maior o título, mais avançada a doença. Destaca-se a importância de uma correlação entre dados clínicos, epidemiológicos e micológicos, uma vez que um resultado negativo de anticorpo, não exclui a possibilidade do diagnóstico, devendo ser utilizado métodos mais sensíveis como os que detectam antígenos (FERNÁNDEZ ANDREU, et al., 2011; AZAR; HAGE, 2017).

Para o diagnóstico de HD, o padrão ouro é a detecção de antígenos específicos de *Histoplasma* spp. circulantes (galactomanana). Os testes baseados na detecção de antígenos apresentam sensibilidade de 98% e especificidade de 97% em PVHA e atualmente é método recomendado como de primeira escolha para o diagnóstico de HD (OPAS/ OMS, 2020). O HGM-EIA (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) apresenta alta especificidade decorrente da sua sensibilização com anticorpos que possuem sítios de ligação correspondentes para os

epítomos presentes nos antígeno do fungo, sendo rara a reação cruzada com outros fungos que também tem em sua parede celular a presença do polissacarídeo, como o *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Aspergillus* spp. (WHEAT et al., 1986; XAVIER et al., 2009; FERNÁNDEZ ANDREU et al., 2011; RIVIÈRE et al., 2012).

O HGM-EIA (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) baseia-se no método de ELISA e permite a interpretação dos resultados pela comparação dos valores com a curva padrão determinada pelo uso de sete concentrações pré-determinadas fornecidas junto ao kit (padrões), sendo amostras positivas aquelas com valores  $\geq 0,20$  ng/mL). O resultado pode ser também interpretado pelo procedimento de ponto de corte baseado no calibrador, que utiliza apenas uma concentração padrão e permite considerar positivas amostras com valores  $\geq 1$  UEIA. A utilização da interpretação baseada no calibrador implica um melhor rendimento do teste, permitindo maior número de amostras analisadas e, portanto, redução de custos na execução do ensaio. Estudo de Blan et al. (2022), oriundo desta dissertação de mestrado (item 5.1 Artigo), promoveu a otimização do ponto de corte pelo procedimento de corte baseado no calibrador do HGM-EIA, passando a considerar positivo valores  $\geq 0,8$  UEIA. Essa otimização ocorreu fundamentada em PVHA previamente diagnosticadas com HD utilizando interpretação pela curva padrão em associação com manifestações clínicas e achados em exames de imagem do tórax.

A pesquisa de antígeno urinário para HD passou a compor a lista de exames diagnósticos essenciais da OMS desde o ano de 2019 (OMS, 2019). Em adição o *Guideline* que traça diretrizes para o diagnóstico e tratamento da HD entre as PVHA, recomenda a utilização do método de detecção de biomarcador urinário para HD, tendo em vista a precocidade da liberação do resultado e utilização de amostra de fácil obtenção (CÁCERES et al., 2019b; OPAS/ OMS, 2020). A implementação desse teste na rotina diagnóstica implica uma precocidade no diagnóstico de HD propiciando um tratamento adequado com resultante redução da mortalidade (SAMAYOA et al., 2017; FALCI et al., 2019). No entanto, infelizmente ainda é, em 2024, um recurso diagnóstico limitado, não sendo disponibilizado pelo SUS na rotina diagnóstica dos hospitais brasileiros.

### **2.7.5 Biologia Molecular**

A identificação de patógenos fúngicos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido cada vez mais estudada, uma vez que podem fornecer precocidade diagnóstica com taxas elevadas de sensibilidade, especificidade, e resultados rápidos, a partir da utilização



de diferentes amostras clínicas como tecidos e fluídos corporais, mostrando-se ferramentas promissora para futura implementação na rotina diagnóstica (DANTAS et al., 2018; CÁCERES, 2019a). Os métodos mais estudados para diagnóstico da histoplasmose incluem: PCR convencional, Nested PCR, PCR em tempo real e a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP - *loop-mediated isothermal amplification*) (BUIRAGO et al., 2013; CÁCERES et al., 2020). Os protocolos envolvem processos de extração, purificação e amplificação do DNA do fungo em busca de genes específicos capazes de identificar as espécies de *Histoplasma* spp.. No entanto, ainda se encontram em nível de pesquisa, não havendo protocolos padronizados e validados clinicamente, nem kits comercialmente disponíveis, tornando-se ainda um desafio para sua implementação na rotina diagnóstica (DA SILVA ZATTI et al., 2019).

## 2.8 Tratamento da histoplasmose

A terapêutica instituída e duração do tratamento da histoplasmose são dependentes da forma clínica e gravidade da doença. Os antifúngicos de escolha disponíveis são o itraconazol e a anfotericina B (lipossomal, complexo lipídico e desoxicolato) (WHEAT, 2007). O tratamento da histoplasmose é composto por uma fase de indução e uma fase de manutenção. Na fase de indução do tratamento, de manifestações clínicas leves a moderada recomenda-se o uso do itraconazol (200mg, três vezes/dia durante três dias). Para manifestações graves ou moderadamente grave recomenda-se o uso de anfotericina B lipossomal (3,0 mg/kg, por 14 dias), caso indisponível a formulação lipossomal utilizar anfotericina desoxicolato (0,7–1,0 mg/kg, por 14 dias) (OPAS/OMS, 2020). A fase de manutenção tem duração média de 12 meses, e utiliza como antifúngico de escolha o itraconazol (200 mg, duas vezes/dia). Pode-se optar por um período inferior a 12 meses nas situações em que a PVHA está clinicamente estável, em uso de terapia antirretroviral, carga viral indetectável e resposta imunológica estável (CDC, 2020; OPAS/OMS, 2020).

## 2.9 Coinfecção histoplasmose e tuberculose

A coinfecção histoplasmose e TB em PVHA é um desafio, pois os sintomas são muitas vezes confundidos. Na América Latina a taxa dessa coinfecção varia entre 2%, na Venezuela e 38%, no Panamá (CÁCERES; VALDES, 2019). Basso et al. (2022) registrou 29% de coinfecção entre HD e TB em PVHA, sendo a maior taxa relatada no Brasil, que era de 15 a 26% (BOIGUES et al., 2018; FALCI et al., 2019). Acredita-se que a epidemiologia dessa

coinfecção esteja subestimada, uma vez que os profissionais comumente interrompem a investigação após o diagnóstico inicial de uma das IO e, portanto, deixam de verificar a existência de coinfeção (CÁCERES; VALDES, 2019).

Quando a coinfeção é diagnosticada, isso pode levar a um manejo complexo do paciente, com interações medicamentosas que podem afetar o tratamento do HIV, TB e/ou histoplasmose. Em particular, a rifampicina, medicamento utilizado no tratamento da tuberculose, acarreta a redução plasmática de itraconazol, potencialmente levando a tratamento ineficaz para histoplasmose. Em situações como essa, recomenda-se a utilização de anfotericina B para o tratamento durante a fase de indução ou elevar a dose diária do itraconazol, necessitando de monitoramento dos níveis sanguíneos do itraconazol, ou substituir o fármaco rifampicina por rifabutina (CDC, 2020; OPAS/OMS, 2020).

### 3 JUSTIFICATIVA

A epidemia do HIV é um problema de saúde pública desde o seu surgimento. Com o avanço das políticas aplicadas à saúde, investimentos e profissionais qualificados é possível intervir positivamente na qualidade de vida das PVHA. Diante da identificação precoce e tratamento das IO, pode-se reduzir a morbi-mortalidade associada. Estudo prévio realizado no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. (HU-FURG/EBSERH) no período de 2010 a 2019, mostrou um incremento de 300% no diagnóstico de histoplasmose após a capacitação de profissionais de saúde e implementação do método diagnóstico de biomarcador urinário em PVHA. O método diagnóstico além de ter maior sensibilidade, utiliza uma amostra clínica de fácil obtenção e permite liberar o resultado em menor tempo que o cultivo fúngico, permitindo otimizar o diagnóstico, e conseqüentemente iniciar um tratamento precoce, buscando a redução de mortalidade.

Esse método teve sua implementação na rotina diagnóstica do HU-FURG/ EBSERH como rastreio de HD em PVHA assistidos no Hospital desde março de 2021. No intuito de diagnosticar precocemente a HD, o HGM-EIA (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) passou a ser realizado de forma sistemática em PVHA com diagnóstico recente de HIV ou em abandono da terapia antirretroviral (ARV) que apresentassem linfócitos T CD4+ <200 células/mm<sup>3</sup>, e/ou manifestações clínicas sugestivas de HD (febre, perda de peso, sudorese noturna, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, linfonodomegalia, alterações pulmonares, lesões mucocutâneas e/ou comprometimento neurológico) e/ou exame de imagem de tórax sugestivo de HD.

Diante do fato de ser um método diagnóstico de recente comercialização, optou-se pela utilização da interpretação do HGM-EIA pela curva padrão, método que oferece maior segurança laboratorial e robustez frente a um contexto recente de implementação na rotina diagnóstica, porém a interpretação pelo calibrador proporcionaria um melhor rendimento do teste abrangendo um maior número de pacientes investigados por kit. Portanto, buscou-se a otimização da interpretação do HGM-EIA pelo calibrador.

Considerando que no Brasil, o estado do Rio Grande do Sul registrou em 2022 a maior taxa bruta de mortalidade associada a aids (9,8/100.00 habitantes) e o município do Rio Grande/RS, ocupa no ranking brasileiro dentre município de mais de 100.000 habitantes a 9ª posição quanto a incidência de HIV/aids de acordo com o índice composto (BRASIL,2023) destaca-se o preocupante cenário quanto a epidemiologia local das IO. Dessa forma buscou-se analisar dados clínicos e epidemiológicos das PVHA com diagnóstico de HD, e os impactos no

prognóstico do paciente e na mortalidade após implementação sistemática do método de biomarcador urinário como teste de rastreio de HD em PVHA no HU-FURG/EBSERH.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Otimizar a interpretação do teste de biomarcador urinário para diagnóstico de HD baseado no ponto de corte pelo calibrador, e avaliar o impacto da implementação desse teste como rastreio de HD na epidemiologia, na precocidade diagnóstica e no prognóstico dessa IO em PVHA em um hospital terciário do Extremo Sul do Brasil.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Comparar a interpretação dos resultados do teste de biomarcador urinário entre os distintos protocolos fornecidos pelo próprio fabricante do kit;
- Propor ponto de corte para interpretação do HGM-EIA baseado no protocolo de uso do calibrador a partir de dados clínicos e laboratoriais para diagnóstico de HD em PVHA no HU-FURG/EBSERH.
- Descrever o perfil clínico e epidemiológico da população de estudo;
- Avaliar a taxa de incidência e a taxa de mortalidade da HD em PVHA no período de 18 meses;
- Comparar a frequência e o desfecho da HD entre o período pré e pós implementação do teste de rastreio em PVHA atendidos na mesma instituição;
- Comparar a frequência do diagnóstico utilizando métodos clássicos e biomarcador urinário;
- Avaliar a taxa de detecção do biomarcador urinário após 90 dias do início da terapia antifúngica.

## 5 RESULTADOS

Os resultados desse estudo são apresentados em formato de artigos científicos (n=2) que contemplaram os objetivos da pesquisa. Foram elaborados dois documentos científicos, sendo um artigo já publicado e um manuscrito formatado para submissão a periódico científico.

### 5.1 Artigo

Artigo científico intitulado “Optimization of a commercial *Histoplasma* galactomannan EIA test in a population from an endemic area of histoplasmosis in southern Brazil” publicado no ano de 2022 no periódico *Mycoses*, fator de impacto JCR 4,9.

Received: 24 October 2022 | Revised: 9 December 2022 | Accepted: 10 December 2022

DOI: 10.1111/myc.13554

ORIGINAL ARTICLE

## Optimization of a commercial *Histoplasma* galactomannan EIA test in a population from an endemic area of histoplasmosis in southern Brazil

Bianca dos Santos Blan<sup>1</sup> | Vanice Rodrigues Poester<sup>1</sup> | Rossana Patricia Basso<sup>2</sup> | Jéssica Louise Benelli<sup>2</sup> | Karine Ortiz Sanchotene<sup>2</sup> | Diego H. Caceres<sup>3,4,5</sup> | Brian Doherty<sup>3</sup> | Alessandro Comarú Pasqualotto<sup>6</sup> | Melissa Orzechowski Xavier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil

<sup>2</sup>Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (HU- FURG/ EBSERH), Rio Grande, Brazil

<sup>3</sup>IMMY, Norman, Oklahoma, USA

<sup>4</sup>Center of Expertise in Mycology Radboudumc/CWZ, Nijmegen, The Netherlands

<sup>5</sup>Studies in Translational Microbiology and Emerging Diseases (MICROS) Research Group, School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, Bogota, Colombia

<sup>6</sup>Programa de Pós- Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, Brazil

### Correspondence

Melissa Orzechowski Xavier, Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul (RS), Brazil. [Email: melissaxavierfurg@gmail.com](mailto:melissaxavierfurg@gmail.com)

### Abstract

**Background:** Since 2020 the World Health Organization (WHO) recommends *Histoplasma* antigen detection for the diagnosis of disseminated histoplasmosis (DH) in people living with HIV (PLHIV).

**Objective:** Here we aimed to optimise the IMMY's Clarus® *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (EIA), evaluating the best cut- off in the semi- quantitative (SQ- HGM EIA), also known as 'calibrator cut- off procedure'.

**Methods:** The optimization was done using the quantitative standard procedure (Q- HGM EIA), also known as 'standard curve procedure', as reference test. A retrospective study from an endemic area of DH in southern Brazil was carried out including 264 patients investigated for DH using the test. Receiver Operator Characteristic curve was plotted, and sensitivity and specificity of the SQ- HGM EIA were calculated. **Results:** The study included 24 positive (values  $\geq 0.20$  ng/ml) and 240 negative patients by the Q- HGM EIA. According to the manufacturer SQ- HGM EIA protocol, the new SQ- HGM EIA cut- off of 0.8 EIA units was validated, resulting in sensitivity and specificity of 88% and 98.7%, respectively.

**Conclusion:** Our study pioneers and brings important data about the optimization of the *Histoplasma* antigen testing for the diagnosis of DH in a population from Southern Brazil. This optimization also reduced the amount of reagents used, lowering the cost associated with testing.

### KEYWORDS

biomarker, disseminated histoplasmosis, *Histoplasma* spp., HIV patients, systemic fungal infection.

## 1 | INTRODUCTION

Disseminated histoplasmosis (DH) is caused by *Histoplasma capsulatum*, affecting mainly people with immunosuppression, this disease is associated with high morbimortality in the Americas, and is an important AIDS- defining diseases in people living with HIV (PLHIV).<sup>1-3</sup> Since the late diagnosis of DH results in a worse prognosis and higher mortality rate, it is essential to provide specific, sensitive, and rapid diagnostic tests for DH, aiming an earlier detection and correct treatment.<sup>4</sup> In fact, according to the last guideline, it is recommended that all PLHIV with a CD4+ T lymphocyte (LTCD4+)

count < 200 cells/mm<sup>2</sup> be investigated for DH using the *Histoplasma* spp. antigen testing, which is considered the most accurate test for the detection of DH in PLHIV.

Clarus® *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (HGM EIA) (IMMYTM) is a commercially available EIA kit, validated for the detection in urinary samples of *Histoplasma* antigens (Ag), this performed with a sensitivity of 98% and a specificity of 97%.<sup>5</sup> Besides the proved efficacy, *Histoplasma*- GM EIA, provides quicker results, in comparison with culture and other classical mycological tests, and do not require an invasive procedure to obtain the biological sample (spontaneous urine).<sup>5</sup>

There are two procedures on the Clarus® HGM EIA. The quantitative standard procedure (Q- HGM EIA), also known as ‘standard curve procedure’ uses a seven- concentration standard curve, and provides quantitative results in ng/ml. This Q- HGM EIA uses a cut- off  $\geq 0.20$  ng/ml for positive results. The second procedure used a calibrator for the calculation of an index, this procedure is considered a semi- quantitative assay (SQ- HGM EIA) and is also known as ‘calibrator cut- off procedure’. The SQ- HGM EIA reports results in EIA units, and based on manufacturer, this procedure uses a cut- off of  $\geq 1$  EIA units for positive results. The SQ- HGM EIA allows to test a greater number of specimens per kit, resulting in cost- benefit due to the reduction of reagents used during testing. However, the SQ- HGM EIA can be less sensitive in comparison with the results obtained with the Q- HGM EIA, for that reason we aimed to optimise the SQ- HGM EIA, evaluating the best cut- off in EIA units, using the Q- HGM EIA as reference test.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

A retrospective study was carried out including all patients investigated for DH using the Q- HGM EIA, during the period from March 2021 to May 2022 in a tertiary hospital (*Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr.*, Rio Grande - HU- FURG/ EBSEH), located in southern Rio Grande do Sul, Brazil. HU- FURG/ EBSEH has a Specialized Care Service in Infectious Diseases and a referral center for PLHIV care. Our hospital provides comprehensive care through the Unified Health System (SUS) and a single- network municipal and state health service, being a reference in the medium and high complexity care for another 22 municipalities from the 7th Regional Health Coordination of Southern Brazil.<sup>6</sup>

Since March 2021, as a local protocol, Q- HGM EIA was carried out systematically in patients with a recent diagnosis of HIV/aids and/or with LTCD4+  $< 200$  cells/mm<sup>3</sup> and/or with clinical manifestations suggestive of DH. Urine specimens were processed at the Mycology Laboratory – Faculty of Medicine of the Federal University of Rio Grande (FAMED- FURG), using the Clarus® *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (HGM EIA). Specimens were tested following manufacturer instructions using the standard curve procedure (Q- HGM EIA). DH cases were defined by the presence of symptoms such as respiratory symptoms, generalised lymph node enlargement, cutaneous lesions, fever, and/or images suggestive of the disease, plus a Q- HGM EIA with a value  $\geq 0.20$  ng/ ml of *Histoplasma* urinary antigen. Non- histoplasmosis was defined as patient with a negative Q- HGM EIA,  $< 0.20$  ng/ml of *Histoplasma* urinary antigen, without any other laboratory evidence histoplasmosis.

For the SQ- HGM EIA method, data were reanalysed, extracting the information of optical densities obtained during testing, and calculating the EIA units, following the calibrator cut- off procedure (SQ- HGM EIA). Then, a Receiver Operator Characteristic (ROC) curve was plotted, and sensitivity and specificity of distinct cut- offs were calculated. Furthermore, the ROC curve has its precision expressed by the area under the curve.

LTCD4+ count, antiretroviral use, and outcome were data collected in the laboratory's own database and in the electronic or physical medical records of the Specialised Assistance Service. Patients with incomplete medical records, without essential clinical and epidemiological data for the

evaluation of the case- disease were excluded. The study was approved by the Ethics Committee of the University (CEP- FURG n. 234/2018).

## 3 | RESULTS

The study included 264 urinary samples, from 226 patients, tested by Q- HGM EIA, being most of the specimens from PLHIV (86%,  $n = 228$ ). The remnant specimens were obtained from immunosuppressed patients due to another clinical condition (such as autoimmune disease, use of immune- response- modifying medications or haemodialysis). The distribution of samples between gender was similar (52% male and 48% female), and the mean age was 45 years (ranging from 6 to 79 years, standard deviation of 12 years). From the total of patients tested, 24 were positive for Q- HGM EIA (values  $\geq 0.20$  ng/ml), all of them presented symptoms suggestive of the disease, confirming the diagnosis of DH, and 240 tested negative (Q- HGM EIA  $< 0.20$  ng/ml).

Analysing the results according to the calibrator protocol, from those 24 patients with positive results using the Q- HGM EIA ( $> 0.20$  ng/ml), 17 patients had values  $\geq 1$  EIA units using the calibrator cut- off procedure (SQ- HGM EIA), and other seven patients showed values between 0.8 and 1 EIA units, all of them with clinical manifestations of DH. Plotting all the values, from positive ( $n = 24$ ) and negative patients ( $n = 240$ ), ROC curve showed a sensitivity of 72% and a specificity of 100% using the cut- off suggested by the manufacturer ( $\geq 1$  EIA units). However, using values  $\geq 0.8$  EIA units as the cut- off resulted in sensitivity and specificity of 88% and 98.7%, respectively (Table 1).

## 4 | DISCUSSION

Clarus® *Histoplasma* GM enzyme immunoassay is an available test in the international market, and has FDA, CE and ANVISA (Brazilian regulatory

**TABLE 1** Analyses of receiver operator characteristic (ROC) curve to results of urinary samples ( $n = 264$ ) tested by the calibrator cut- off procedure (SQ- HGM EIA)

Cut-off	Sensitivity	Specificity	Accuracy
	% (95% CI)	% (95% CI)	% (95% CI)
$\geq 0.6$	96 (94– 98)	82 (80– 84)	85 (83– 87)
$\geq 0.7$	88 (86– 90)	90 (88– 92)	92 (90– 94)
$\geq 0.8$	88 (86– 90)	99 (96– 100)	100 (97– 100)
$\geq 0.9$	84(82– 86)	100 (98– 100)	99 (96– 100)
$\geq 1$	72 (70– 74)	100 (98– 100)	97 (95– 100)

*Note:* Results from a population from an endemic area for histoplasmosis in southern Brazil and diagnosed using results of a quantitative standard procedure (Q- HGM EIA) for detection of

*Histoplasma* antigens and correlation of clinical and epidemiological findings.

*Note:* ROC area of 0.98 (95% CI = 0.96–1).

Abbreviation: (95% CI) 95% confidence interval

agency) approval for in vitro diagnostic. However, in view of the new status and still scarce accessibility of the test, improvements can be made in its performance. This pioneering study is the first to provide important data for the optimization of the HGM EIA, which is currently the recommended test for the diagnosis of DH in PLHIV.<sup>4</sup>



We propose a new cut-off of the test to determine positive samples in our population changing it from 1 to 0.8 EIA units. This optimization increased the sensitivity of the test by 16%, reducing just the specificity rate by only 1.25%, in comparison with the cut-off suggested by the manufacturer (IMMYTM).

This validation was developed in an endemic area of DH in Brazil,<sup>7</sup> and including a substantial number of patients ( $n = 264$ ) from a city that has the fourth highest prevalence of PLHIV among Brazilian cities with more than 100,000 inhabitants. In this region, an increase in 300% in the diagnosis of DH occurred after adding the urine biomarker test (*Histoplasma*- GM EIA®) in the laboratorial service.<sup>6</sup> We did not observe association between antigen concentration, by both procedure evaluated, and severity of disease. Futures studies evaluating antigen testing in asymptomatic people at risk of histoplasmosis are needed.

As is well known, the importance of optimising diagnostic tests in endemic populations for infectious diseases according to their different regions is desirable, inferring robust and trustworthy assay results, and reducing cost associated with testing. Thus, our data provides the validation of a new cut-off for the SQ- HGM EIA for the diagnosis of histoplasmosis in Southern Brazil, allowing for better performance of the test. This optimization, with improved sensitivity, results in lowest quantity of controls used (in comparison with curve protocol) in each test, guaranteeing a cost– benefit impact, with a better use of public funding of Brazilian SUS, which will benefit direct and indirectly several other patients.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.S.B. conceptualization, methodology, and writing of original draft;  
V.R.P. conceptualization, methodology, and writing of original draft,

review, and supervision; R.P.B. clinical investigation and methodology; J.L.B. methodology; K.O.S. methodology; D.H.C. formal analysis and writing review and editing; B.D. formal analysis and writing review and editing; A.C.P. writing review and editing; M.O.X. conceptualization, methodology, writing of original draft, review, and supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and to *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

#### FUNDING INFORMATION

This research received no external funding.

#### CONFLICT OF INTEREST

B. S. B., V. R. P., R. P. B., J. L. B., K. O. S., and M. O. X. declared that they have no conflicts of interest pertaining to this work. A. C. P. has received research grants from Gilead. He has given paid talks on behalf of Gilead, United Medical, Pfizer, MSD, and IMMY. D. H. C. and B. D. are IMMY employees.


#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Federal University of Rio Grande (CEP- FURG n. 234/2018).

#### ORCID

Bianca dos Santos Blau  <https://orcid.org/0000-0002-4647-4792> Vanice Rodrigues Poester <https://orcid.org/0000-0001-7121-3861>

Jéssica Louise Benelli <https://orcid.org/0000-0002-9309-5349>  
Diego H. Caceres <https://orcid.org/0000-0001-8749-9809>

#### REFERENCES

1. Ministério da Saúde. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos*. Minist da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde; 2018:416.
2. Almeida MA, Almeida- Silva F, Guimarães AJ, Almeida- Paes R, Zancopé- Oliveira RM. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 2019;86:147- 156.
3. Pasqualotto AC, Quieroz- Telles F. Histoplasmosis dethrones tuberculosis in Latin America. *Lancet Infect Dis*. 2018;10:1058-1060.
4. PAHO/WHO. Guidelines for diagnosing and managing disseminated histoplasmosis among people living with HIV. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52304/9789275122495-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accessed on 30 Ago 2022).
5. Cáceres DH, Samayoa BE, Medina NG, et al. Multicenter validation of commercial antigenuria reagents to diagnose progressive disseminated histoplasmosis in people living with HIV/AIDS in two Latin American countries. *J Clin Microbiol*. 2018;56:e01959- e01917.
6. Basso RP, Poester VR, Benelli JL, Stevens DA, Xavier MO. Disseminated histoplasmosis in persons with HIV/AIDS, southern Brazil, 2010- 2019. *Emerg Infect Dis*. 2022;28:721- 724.
7. Ministério da Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico HIV/AIDS*. Ministério da Saúde; 2021.

## 5.2 Manuscrito

Manuscrito intitulado “Disseminated histoplasmosis in people living with HIV-aids in Southern Brazil: A screening systematic study using urinary antigen” formatado de acordo com as normas do periódico *Medical Mycology*, fator de impacto 2,9.

MANUSCRITO 2

## **Disseminated histoplasmosis screening through urinary antigen detection in people living with HIV-aids in Southern Brazil**

Bianca dos Santos Blan<sup>1</sup>, Vanice Rodrigues Poester<sup>1</sup>, Rossana Patricia Basso<sup>1,2</sup>, Karine Ortiz Sanchotene<sup>1,2</sup>, Ivy Bastos Ramis de Souza<sup>1</sup>, Melissa Orzechowski Xavier<sup>1</sup>

[1] *Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande do Sul (RS), Brazil*; [2] Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. (HU-FURG), vinculado à Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), RS, Brazil

**Corresponding author:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melissa Orzechowski Xavier. Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Saúde. Visconde de Paranaguá 102, Centro, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. **Telefone:** (+55) 53-32374636/4634. **e-mail:** melissaxavierfurg@gmail.com

### **ABSTRACT**

Disseminated histoplasmosis (DH), a systemic mycosis caused by *Histoplasma* spp., is one of the main opportunistic infections (OI) in people living with HIV/AIDS (PLWHA) and is an aids-defining disease responsible for high mortality. Rio Grande City faces a worrying scenario regarding the prevalence of HIV/aids and OI. Aiming to diagnose DH early, since March 2021, the gold standard test has been systematically implemented at HU-FURG/EBSERH using enzyme immunoassay with detection of Galactomannan from *Histoplasma* spp. (HGM-EIA, IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) in all PLWHA with LTCD4+< 200 cells/mm<sup>3</sup>, abandoning treatment or recently diagnosed with HIV and/or clinical manifestations and/or chest imaging suggestive of DH. This study aimed to evaluate the impact of an 18-month systematic implementation of HGM-EIA as a screening method for DH in a reference service for PLWHA attendance in Southern Brazil. The study covered all PLWHA with DH from March 2021 to September 2022. The analysis was performed using the chi-square test in the SPSS 24.0 program (IBM® SPSS Statistics), considering p<0.05 values to be significant. Ethical aspects were respected (SEI n° 28/2022 and CEP-FURG n° 5,578,347). The prevalence of DH in PLWHA was 9% (26/287), which resulted in an increase of more than 200% in the diagnosis rate of this OI and a 30% reduction in the mortality rate compared with previous studies. The use of screening in the diagnosis of DH provided early diagnosis, which allowed adequate treatment, impacting the mortality rate, and better use of Brazilian SUS resources.

**KEYWORDS:** Human immunodeficiency virus. Acquired immunodeficiency syndrome. Opportunistic infections. *Histoplasma* spp. Immunodiagnosis.

## Introduction

Disseminated histoplasmosis (DH), is a severe fungal opportunistic infection (OI) caused by *Histoplasma* spp. associated with high morbimortality in immunosuppressed patients from mostly American continents<sup>1</sup>. People living with HIV and aids (PLWHA) constitute one of the greatest risk groups for developing DH, which is an aids-defining illness. DH is considered endemic in North America in the Ohio Valley and Mississippi Valley regions, in several African countries, and much of Latin America, with reported mortality rates of approximately 40%. Brazil is one of the areas endemic disease that records more than 5000 cases of DH in PLWHA per year<sup>2-5</sup>.

Since its neglected status and the overlapping symptoms with other pulmonary illnesses, DH are frequently misdiagnosed as tuberculosis. Consequently, a delay in perform specific laboratorial investigation for DH occurs, which culminates to more severe manifestation of the disease and higher mortality rates in PLWHA<sup>6,7</sup>. Besides that, the gold standard for DH diagnosis recommended by the World Health Organization (WHO) and Pan American Health Organization (PAHO)<sup>8</sup>, a urinary biomarker test, although shows a high sensitivity and specificity rates, is unfortunately unavailable in the majority of economically poor areas.

An epidemiological study developed in Southern Brazil, in a city (Rio Grande) with the ninth highest rate of incidence of PLWHA among Brazilian cities, showed that implementation of *Histoplasma* spp. urinary antigen in the diagnostic routine had increased the local diagnosis of DH in PLWHA by 300%. However, in this study, the diagnosis was still late, presenting a mortality rate of patients of 35%<sup>9</sup>. A vital strategy to reduce the mortality is early diagnosis of DH in PLWHA. To this end, it is recommended to perform the urinary antigen test for DH as a screening method for all PLWHA who has CD4+ lymphocytes count < 200 cells/mm<sup>3</sup> <sup>2,8</sup>. Therefore, we aimed to evaluate the impact of an 18-month systematic implementation of *Histoplasma* spp. urinary antigen detection as a screening method for DH in a reference service to PLWHA attendance in Southern Brazil.

## Materials and methods

### Study design

A retrospective study was carried out including a period from March 2021 to September 2022 in a tertiary hospital (*Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr.*, Rio Grande - HU-FURG/ EBSEH) located in southern Rio Grande do Sul, Brazil. HU-FURG/EBSEH has a specialized care service for infectious diseases and is a referral center for PLWHA assistance.

The hospital is all integrated in the Unified Health System (SUS), being a reference in the medium- and high-complexity care for another 22 municipalities from the 7th Regional Health Coordination of Southern Brazil<sup>9</sup>.

PLWHAs investigated by IMMY's Clarus® *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (HGM-EIA) (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) following the criteria: 1) recently diagnosis (up to 30 days) of HIV/AIDS OR 2) abandonment of antiretroviral therapy AND/OR 3) CD4+ lymphocytes <200 cells/mm<sup>3</sup> AND/OR 4) clinical manifestations suggestive of DH (fever, weight loss, night sweats, pancytopenia, hepatosplenomegaly, lymph node enlargement, pulmonary changes, mucocutaneous lesions and/or neurological impairment) AND/OR 5) image exam chest with air space opacification and/or multiple pulmonary nodular and/or mediastinal lymph node enlargement, were included in the study. The exclusion criteria were patients with incomplete medical data.

HGM-EIA (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) was performed using the calibrator cut-off procedure (SQ-HGM-EIA) following the optimization described by Blan et al. (2022) [cut-off 0.8 EIA units (UEIA)]<sup>10</sup>. Thus, DH cases were defined as patients with clinical and/or radiological findings and SQ-HGM EIA value  $\geq 0.8$  UEIA. Clinical-epidemiological data of patients were collected in electronic or physical health records from the databases of the HU-FURG/EBSERH and the Mycology Laboratory (FAMED-FURG).

Data analyses of patients included HIV Viral Load (categorized as undetectable, up to 50 copies/mL, and  $\geq 50,000$  copies/mL), CD4+ lymphocytes count (categorized as < 50 cells/mm<sup>3</sup>,  $\geq 50$  to < 100 cells/mm<sup>3</sup>,  $\geq 100$  to < 200 cells/mm<sup>3</sup>, and  $\geq 200$  cells/mm<sup>3</sup>), DH aids-defining illness (yes or no), assistance type (ambulatory appointment or hospitalization), co-infections, mycological classical tests results (culture and/or direct mycological exam), quantitative HGM EIA result, use of antiretroviral therapy (ART), antifungal therapy (AFT), clinical signs [respiratory, cutaneous, neurological, lymph node enlargement, hepatomegaly, splenomegaly, weight loss, fever ( $>37.8$  °C), and/or night sweats], image exam chest (air space opacification, multiple pulmonary nodular and/or mediastinal lymph node enlargement) and clinical outcome 90 days after diagnosis of DH.

Variables were evaluated through frequency analysis and using the Chi-Square test in the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA),  $p < 0.05$  was considered as significant. In addition, it was calculated the global incidence rate of DH, depending on the attendance type of patients, hospitalization (per 1,000) or ambulatory appointment (per 1,000) in the PLWHA referral service.

## Results

In the 18 months of the study, 287 PLWHA were investigated for DH using the *Histoplasma* GM EIA test. Patients were predominantly male (57%; 165/287), with a mean age of 43.1 years old (ranging from 18 to 77 years old, standard deviation 12.1). Concerning the type of appointment, 80% (231/287) were assisted in ambulatorial settings, while 20% (56/287) during hospitalizations, and around half (54%, 151/282) of patients presented CD4+ lymphocyte counts <200 cells/mm<sup>3</sup> (Table 1).

From the total of the PLWHA included, DH was confirmed in 9% (26/287), being an aids-defining illness in 27% of them (7/26). Among DH patients, 65% (17/26) were male with a mean age of 41 years old (ranging between 26 and 68 years old; standard deviation: 12.18 years old). CD4+ lymphocyte count was <200 cells/mm<sup>3</sup> in 62% (16/26) of the patients, being 38% (10/26) of the DH cases occurring in PLWHA with <50 cells/mm<sup>3</sup> (p=0.02) (Table 2). Image exams of the chest were requested in 92% (24/26) of PLWHA with DH, with signs indicative of DH in 92% (22/24) of the examinations requested, showing air space opacification in 68% (15/22) of patients, multiple pulmonary nodules in 59% (13/22), and mediastinal lymph nodes enlarged in 23% (5/22).

Regarding clinical signs in DH patients, respiratory signs were present in 72% (18/25) of cases, weight loss in 64% (16/25), fever in 56% (14/25), cutaneous lesions in 40% (10/25), neurological in 36% (9/25), lymph node enlargement in 32% (8/25), night sweats in 28% (7/25), splenomegaly in 8% (2/25) and hepatomegaly in 4% (1/25). Other clinical manifestations were reported in 46% (12/25) of patients, including urinary complaints (5/25), acute renal failure (3/25), oral mucosal lesions (2/25), swallowing difficulties (2/25), asthenia (3/25), dehydration (2/25), and malnutrition (2/25).

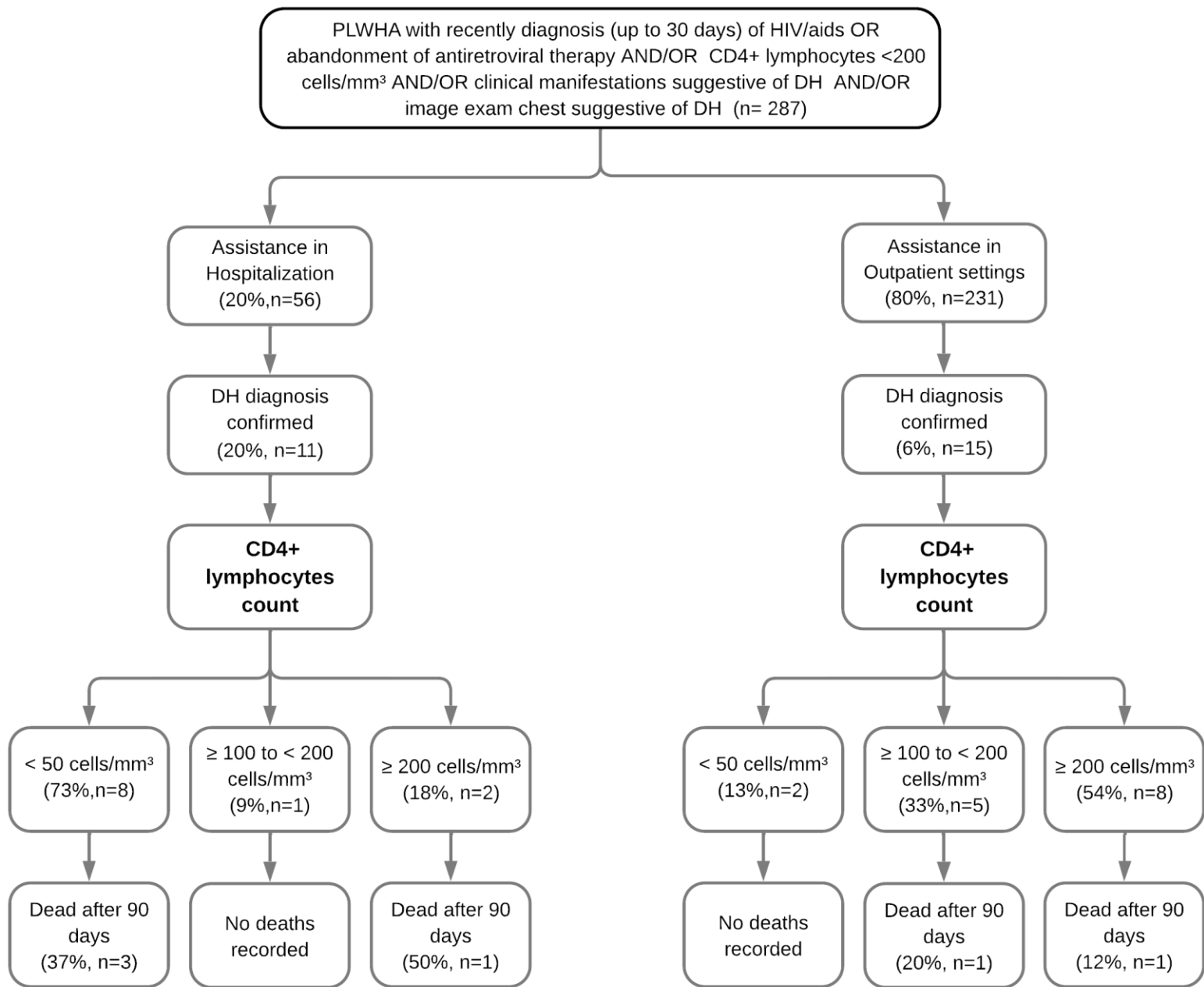
DH was diagnosed in the context of outpatient care in 58% (15/26) of patients, while the other 42% (11/26) were diagnosed at hospitalization (Figure 1). Stratifying patients according with their type of assistance, the prevalence of DH in PLWHA assisted in the hospitalization service was 20% (11/56), and in outpatient settings was 6% (15/231) (p=0.002). The general incidence of DH at HU- FURG/EBSERH was 8 cases per 1,000 PLWHA, which corresponded to 2 cases per 1,000 PLWHA at outpatient settings and 39 cases per 1,000 PLWHA in the context of hospital admissions.

AFT was administered to 88% (23/26) of PLWHA with DH, using amphotericin B deoxycholate intravenously in 44% (10/23), and oral therapy with itraconazole in 56% (13/23), the other two patients had missing data if they used AFT and one patient died before the

beginning of the treatment. Twenty-seven percent (4/15) of DH patients who attended outpatient service required hospitalization for antifungal treatment, while the remaining (73%, 11/15) received oral treatment (ITZ) at home. In the hospitalized patients, the time between hospital admission and HGM- EIA request was up to seven days in 73% of patients (8/11) and after 7 days in 27% (3/11). The follow-up 90 days after the start of AFT with new sample collection for HGM-EIA occurred in 61% (16/26) of PLWHA with DH. The test was effective in confirming clinical improvement, being negative after 90 days of starting treatment in 75% (12/16) of the patients, remaining detectable only in those with poor adherence to AFT (25%, 4/16). The 90-day outcome was assessed in 96% (25/26) of PLWHA with DH, resulting in death in 24% (6/25) of cases.

Additional classic diagnostic methods (mycological culture and direct mycological exam) were performed in 61% (16/26) of the patients being positive in 18% of them (3/16), through respiratory samples or skin biopsy. Immunodiffusion tests were performed in 42% (11/26) of DH patients, being negative in all of them.

TB and DH were investigated concomitantly in 58% (167/287) of the total number of patients included in the study, with TB confirmed in 31% (53/167) of patients. Among PLWHA with DH, TB was investigated in 88% (23/26) of patients, with co-infection occurring in 39% (9/23). Approximately 25% (6/23) of the co-infected PLWHA were investigated for TB up to two times before requesting HGM-EIA for the diagnosis of DH. Other non-TB co-infections were investigated in 92% (24/26) of PLWHA with DH, being reported in 58% (14/24) of patients, including pneumocystosis (4/24), syphilis (4/24), hepatitis C (4/24), cryptococcosis (2/24), candidiasis (2/24), neurotoxoplasmosis (2/24), genital herpes (1/24), pityriasis versicolor (1/24), bacterial endocarditis (1/24) and HPV (1/24).



\*CD4+ lymphocytes count  $\geq 50$  to  $< 100$  cells/mm<sup>3</sup> were not registered in PLWHA with DH.

Figure 1- Flowchart of the 287 people living with HIV/aids (PLWHA) included in the study showing data regarding disseminated histoplasmosis (DH) at the University Hospital Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., Rio Grande, Brazil, 2021-2022.



Table 1- Clinical-epidemiological data from 287 people living with HIV/aids (PLWHA) investigated for disseminated histoplasmosis (DH) at the University Hospital Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., Rio Grande, Brazil, 2021-2022.

Variables (n)	HGM-EIA in PLWHA (n)				p value
	Not detectable (261)		Detectable (26)		
	%	n	%	n	
<b>Year of DH Investigation</b>					0.487
2021 (125)	<b>90</b>	112	<b>10</b>	13	
2022 (162)	<b>92</b>	149	<b>8</b>	13	
<b>Sex</b>					0.204
Male (165)	<b>90</b>	148	<b>10</b>	17	
Female (122)	<b>93</b>	113	<b>7</b>	9	
<b>Type of assistance</b>					<b>0.002</b>
Outpatient setting (231)	<b>94</b>	216	<b>6</b>	15	
Hospitalization (56)	<b>80</b>	45	<b>20</b>	11	
<b>CD4+ lymphocytes</b>					<b>0.021</b>
< 50 cells/mm <sup>3</sup> (52)	<b>81</b>	42	<b>19</b>	10	
≥50 and < 100 cells/mm <sup>3</sup> (n=30)	<b>100</b>	30	<b>0</b>	0	
≥ 100 and < 200 cells/mm <sup>3</sup> (69)	<b>91</b>	63	<b>9</b>	6	
≥ 200 cells/mm <sup>3</sup> (131)	<b>92</b>	121	<b>8</b>	10	
Missing (5)		5		0	
<b>Death after 90 days</b>	<b>13</b>	30	<b>24</b>	6	0.120
Missing (36)		35		1	

HGM-EIA: *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA).

Table 2- Clinical-epidemiological data from 26 people living with HIV/aids (PLWHA) with disseminated histoplasmosis (DH) according to type of assistance at the University Hospital Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., Rio Grande, Brazil, 2021-2022.

Variable	Type of assistance in PLWHA with DH (n)					
	Outpatient settings (15)		Hospitalization (11)		Total (26)	
	%	n	%	n	%	n
<b>CD4+ lymphocytes</b>						
< 50 cells/mm <sup>3</sup>	<b>13</b>	2	<b>73</b>	8	<b>38</b>	10
≥50 and < 100 cells/mm <sup>3</sup>	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0
≥ 100 and < 200 cells/mm <sup>3</sup>	<b>33</b>	5	<b>9</b>	1	<b>24</b>	6
≥ 200 cells/mm <sup>3</sup>	<b>54</b>	8	<b>18</b>	2	<b>38</b>	10
<b>HIV Viral load</b>						
Undetectable	<b>53</b>	8	<b>18</b>	2	<b>38</b>	10
≥40 and < 50,000 copies/mL	<b>20</b>	3	<b>36</b>	4	<b>27</b>	7
≥50,000 copies/mL	<b>27</b>	4	<b>46</b>	5	<b>35</b>	9
<b>Signs and symptoms</b>						
Respiratory	<b>57</b>	8	<b>91</b>	10	<b>72</b>	18
Weight loss	<b>57</b>	8	<b>73</b>	8	<b>64</b>	16
Cutaneous	<b>43</b>	6	<b>36</b>	4	<b>40</b>	10
Lymph node enlargement	<b>29</b>	4	<b>36</b>	4	<b>32</b>	8
Fever (>37.8°C)	<b>29</b>	4	<b>91</b>	10	<b>56</b>	14
Night sweats	<b>21</b>	3	<b>36</b>	4	<b>28</b>	7
Neurologic	<b>14</b>	2	<b>64</b>	7	<b>36</b>	9
Splenomegaly	<b>7</b>	1	<b>9</b>	1	<b>8</b>	2
Hepatomegaly	<b>0</b>	0	<b>9</b>	1	<b>4</b>	1
Missing	-	1	-	0	-	1
<b>Image exams</b>						
Multiple pulmonary nodular	<b>62</b>	8	<b>72</b>	8	<b>66</b>	16
Air space opacification	<b>46</b>	6	<b>90</b>	10	<b>66</b>	16
Mediastinal lymph node enlargement	<b>8</b>	1	<b>36</b>	4	<b>21</b>	5
Missing	-	2	-	0	-	2
<b>HGM-EIA after 90 days of AFT</b>						
Detectable	<b>18</b>	2	<b>40</b>	2	<b>25</b>	4
Not detectable	<b>82</b>	9	<b>60</b>	3	<b>75</b>	12
Missing	-	4	-	6	-	10
<b>Type of AFT used</b>						
Oral AFT	<b>77</b>	10	<b>20</b>	3	<b>56</b>	13
Intravenous AFT	<b>23</b>	3	<b>70</b>	7	<b>44</b>	10
Missing		2		1		3
<b>Outcome after 90 days</b>						
Improved health	<b>87</b>	13	<b>60</b>	6	<b>76</b>	19
Dead	<b>13</b>	2	<b>40</b>	4	<b>24</b>	6
Missing		0		1		1

HGM-EIA: *Histoplasma* GM enzyme immunoassay (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA);  
AFT= Antifungal therapy.

## DISCUSSION

This study was pioneer in reporting the systematic implementation of HGM-EIA as screening in the DH diagnostic routine in PLWHA in a city with a high prevalence of HIV/aids and endemic for OI in Southern Brazil. The screening criteria were as follows: recent diagnosis of HIV or abandonment of ARV therapy who presented with lymphocytes CD4+ <200 cells/mm<sup>3</sup>, and/or clinical manifestations suggestive of DH and/or chest imaging examination suggestive of DH. Given the local epidemiology, the possibility of early diagnosis of DH in PLWHA would have an impact on quality of life, allowing adequate treatment and a consequent reduction in mortality.

Our study showed DH incidence of 2 cases per 1,000 outpatient consultations and 39 cases per 1,000 hospital admissions. These number shows an increase in the diagnosis rate by more than 200% regarding a previous study conducted by Basso et al. (2022) at the same institution; being 12 cases/1,000 hospitalizations the incidence of DH in PLWHA under hospitalization in that 10 years of the study previously carried. In 19% (6/31) of cases DH an aids-defining disease; this rate was 30% higher in the present study (27%, 7/26). Emphasizing that the use of screening in the diagnosis of DH significantly increases the rate of early diagnoses, allowing adequate treatment and a better prognosis, as the mortality rate obtained in our study (24%) was 30% lower than that recorded by Basso et al. (35%), remaining below the rate found in Brazil<sup>2</sup> of 27%.

In view of the investigation in the context of hospital admission (56/287), 20% (11/56) were positive for DH, and the HGM-EIA request occurred until the seventh day of hospitalization in 72% (8/11) of patients. A study carried out at the same institution<sup>9</sup>, evaluated the diagnosis of DH in PLHIV during hospitalization from 2010 to 2019, showing the occurrence of OI in 31 patients, with a mycological examination being requested to investigate DH on average 10 days from the beginning of hospitalization, compared to the present study, in 18 months of screening the number of diagnoses in the hospital context corresponded to approximately 1/3 of that found in the 10-year period of that study.

The largest study carried out in the field of DH in Brazil <sup>2</sup> in 11 health centers between 2016 and 2018, which demonstrated that 22% (123/570) of PLHIV investigated for DH under hospitalization were positive for DH, with the highest number of cases in Goiânia (50/ 126) and lowest in São Paulo (7/80).

The DH diagnosis rates in PLWHA obtained in this single-center study, lasting 18 months, exceed those reported in the scientific literature. Since in Guatemala between 2017 and

2018, in 16 health centers, 265 people were diagnosed with histoplasmosis, 77% (205/265) DH<sup>11</sup>. In Nigeria, between 2019 and 2021 in 10 health centers, the prevalence of histoplasmosis in PLWHA was 10% (30/303) in the hospital context and 7% (46/685) in the outpatient context<sup>5</sup>. In Uganda, in the year 2022, eight health centers tracked the occurrence of DH in PLWHA at 1.2% in the outpatient setting (4/388)<sup>12</sup>.

Direct mycological examination and culture were positive in only 18% (3/16) of the DH cases from respiratory samples or skin biopsies. As expected, immunodiffusion tests had low sensitivity and did not detect any cases. Basso et al. (2022) diagnosed DH by classical mycological examinations in 45% (14/31) of patients and serological tests in 29% (9/31) of patients. Falci et al (2019) had 23% (29/123) PLWHA diagnosed with DH by classic mycological examinations, while only 0.8% (1/123) were positive for DH on immunodiffusion. Given the use of HGM-EIA, a diagnostic method with high sensitivity rates, the need for its implementation in the diagnostic routine of health centers has become evident as it will allow a greater number of DH diagnoses in PLWHA.

Although the occurrence of DH is related to a CD4+ lymphocyte count of less than 200 cells/mm<sup>3</sup> (WHO, 2023), this study showed that 38% (10/26) of PLWHA with DH had a CD4+ count  $\geq$ 200 cells/mm<sup>3</sup>, on the other hand, this rate was the same as that recorded in patients with a CD4+ count < 50 cells/mm<sup>3</sup>. Basso et al. (2022) reported that 48% (15/31) of PLWHA had a CD4+ count < 50 cells/mm<sup>3</sup>, while only 13% (4/31) had a CD4+ count  $\geq$ 200 cells/mm<sup>3</sup>. Falci et al. (2019) reported that 57% (66/115) of PLWHA patients had a CD4+ count < 50 cells/mm<sup>3</sup>, while 8% (9/115) had a CD4+ count  $\geq$ 200 cells/mm<sup>3</sup>. It is clear that, in this study, we had a high rate of diagnoses in PLWHA with a CD4+ count  $\geq$ 200, a fact that may justify an early diagnosis.

ART use was irregular in 42% (11/26) of patients with PLWHA; however, 42% (11/26) of patients had an undetectable HIV viral load, which may be associated with recent treatment abandonment. Basso et al. (2022) showed that 90% (28/31) of PLWHA in their study were inappropriately using ART; HIV viral load  $\geq$  50,000 copies/mL was recorded in 90% (26/29) of the patients. Falci et al. (2019) observed that 66% (81/123) of PLWHA patients with DH did not adequately perform ART. HIV viral load is a variable that has not been investigated in the scientific literature in DH studies.

In this study, DH and TB co-infections occurred in 39% (9/23) of patients, while other co-infections occurred in 58% (14/24) of PLWHA. Basso et al. (2022) found that the highest DH and TB co-infection rates were reported in Brazil (29%, 9/31), while other co-infections

occurred in at least 61% (19/31) of patients. Falci et al. (2019) reported that 15% (19/123) of PLWHA patients were co-infected with DH and TB. Oladele et al. (2022) reported a 12% (9/76) coinfection rate. Given the similar symptoms, it is common for these OIs to be confused; however, carrying out numerous tests for TB before clinical suspicion of DH delays the diagnosis, impacting the patient's prognosis. Basso et al. (2022) recorded that before requesting the diagnostic test for DH, up to 12 samples were requested for TB screening from the same patient; even with previous negative tests, the average was 5 TB tests per PLWHA. Furthermore, 26% (8/31) of PLWHA, even those with numerous negative results for TB, were empirically treated for OI. Lv et al. (2019) evaluated the diagnosis of histoplasmosis in PLWHA, in China from 2003 to 2016, that 38% (13/34) of PLWHA were wrongly diagnosed with other pathologies and OI before suspecting histoplasmosis.

The drug of choice in the treatment of DH in PLWHA for severe forms is amphotericin B, preferably due to its liposomal presentation, however, due to its high cost, lipid complex and deoxycholate formulations can be used as an alternative in the treatment. Amphotericin B deoxycholate is administered intravenously and requires hospitalization for its administration because it has greater hepatotoxicity than other presentations, and the patient must remain under supervision to monitor possible unwanted effects due to the use of AFT. In our study, 44% (10/23) of PLWHA patients with DH were treated with AFT amphotericin B deoxycholate. Basso et al. (2022) observed that 81% (25/31) of treatments were carried out with amphotericin B deoxycholate. In China, demonstrated that 71% (24/34) of PLWHA were treated with liposomal amphotericin B<sup>13</sup>. Given the rates of use of amphotericin B, it can be seen that our study obtained a lower rate in terms of the need for treatment of the severe form of DH, which may be related to an early diagnosis of OI, not requiring more complex AFT treatment, allowing the oral treatment with itraconazole and consequently a significant reduction in the costs of hospitalizations for DH treatment.

## **CONCLUSION**

The study demonstrated that the use of HGM-EIA as a screening test for DH in PLWHA improves the precocity of the diagnosis, allowing oral treatment with ITZ to occur, and consequently impacting both the clinical outcome and the reduction of costs related to hospitalization for intravenous treatment of DH with AMB and all of its collateral effects. The need to implement HGM-EIA in the diagnostic routine of health centers in Brazil is essential, as it will allow a greater number of DH diagnoses in PLWHA, impacting the clinical outcome, quality of life, reduction of morbidity and mortality, and better use of Brazilian SUS resources.

## REFERENCES

1. Neglected Histoplasmosis in Latin America Group. Disseminated histoplasmosis in Central and South America, the invisible elephant: the lethal blind spot of international health organizations. *AIDS* 2016;30:167–70.
2. Falci DR, Monteiro AA, Braz Caurio CF et al. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and Histoplasma Urine Antigen Detection. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(4). doi:10.1093/ofid/ofz073
3. Torres-González P, Niembro-Ortega MD, Martínez-Gamboa A, Ahumada-Topete VH, Andrade-Villanueva J, Araujo-Meléndez J, et al. Diagnostic accuracy cohort study and clinical value of the Histoplasma urine antigen (ALPHA Histoplasma EIA) for disseminated histoplasmosis among HIV infected patients: A multicenter study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006872. 10.1371/journal.pntd.0006872
4. Kuate MPN, Nyasa R, Mandengue C, Tendongfor N, Bongomin F, Denning DW. Screening for acute disseminated histoplasmosis in HIV disease using urinary antigen detection enzyme immunoassay: A pilot study in Cameroon. *J Microbiol Methods*. 2021;185:106226. 10.1016/j.mimet.2021.106226
5. Oladele RO, Osaigbovo II, Akanmu AS, Adekanmbi OA, Ekeng BE, Mohammed Y, Alex-Wele MA, Okolo MO, Ayanbeku ST, Unigwe US, Akase IE, Dan-Jumbo A, Israelski D, Denning DW, Pasqualotto AC, Chiller T. Prevalence of Histoplasmosis among Persons with Advanced HIV Disease, Nigeria. *Emerg Infect Dis*. 2022 Nov;28(11):2261-2269. doi: 10.3201/eid2811.220542. PMID: 36286009; PMCID: PMC9622240.
6. Pasqualotto AC, Queiroz-Telles F. Histoplasmosis dethrones tuberculosis in Latin America. *Lancet Infect Dis* 2018; 18:1058–60.
7. Pasqualotto AC, Queiroz-Telles F, Chebabo A, Leitão TMJS, Falci DR, Xavier MO, et al. (2023) O “Manifesto da Histoplasmose Porto Alegre” – Abordando a histoplasmose disseminada na AIDS. *PLoS Negl Trop Dis* 17(1): e0010960. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010960>
8. PAHO/WHO. Pan American Health Organization and World Health Organization. Guidelines for Diagnosing and Managing Disseminated Histoplasmosis among People Living with HIV. 2020

9. Basso RP, Poester VR, Benelli JL, Stevens DA, Xavier MO. Disseminated Histoplasmosis in Persons with HIV/AIDS, Southern Brazil, 2010–2019. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(3):721-724. doi:10.3201/eid2803.212150
10. Blan BDS, Poester VR, Basso RP, et al. Optimization of a commercial Histoplasma galactomannan EIA test in a population from an endemic area of histoplasmosis in southern Brazil. *Mycoses.* 2023;66(4):304-307. doi:10.1111/myc.13554
11. Medina N, Alastruey-Izquierdo A, Mercado D, et al. Comparative performance of the laboratory assays used by a Diagnostic Laboratory Hub for opportunistic infections in people living with HIV. *AIDS.* 2020;34(11):1625-1632. doi:10.1097/QAD.0000000000002631
12. Sekar, P.; Nalintya, E.; Kwizera, R.; Mukashyaka, C.; Niyonzima, G.; Namakula, L.O.; Nerima, P.; Fieberg, A.; Dai, B.; Ellis, J.; et al. Prevalence of Histoplasma Antigenuria among Outpatient Cohort with Advanced HIV in Kampala, Uganda. *J. Fungi* 2023, 9, 757. <https://doi.org/10.3390/jof9070757>
13. Lv, X., Meng, J., Jiang, M., He, R., & Li, M. (2019). Clinical features and endemic trend of histoplasmosis in China: A retrospective analysis and literature review. *The Clinical Respiratory Journal.* doi:10.1111/crj.13125

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and to *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

### **DECLARATIONS**

#### **Funding**

Not applicable.

#### **Conflict of Interest**

All authors declare that they have no conflicts of interest pertaining to this work.

#### **Ethics Approval**

The study is authorized by HU-FURG/EBSERH under SEI n° 28/2022 and by the Research Ethics Committee (CEP-FURG) under opinion n° 5.578.347.

#### **Informed Consent**

Informed consent was obtained from the individual participant reported in the study.

## 6 CONCLUSÕES

- A interpretação do HGM-EIA pelo calibrador utilizando o ponto de corte estabelecido pelo fabricante (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA) discordou da interpretação pela curva padrão (falso-negativo) em 29% (7/24) das PVHA com HD confirmada previamente por exames laboratoriais associados a critérios clínicos e exame de imagem de tórax.
- A otimização do ponto de corte pelo calibrador do HGM-EIA, com redução para 0,8 UEIA, demonstrou ser eficaz ao elevar a sensibilidade do teste em 16% e reduzir em apenas 1,25% a taxa de especificidade comparado ao ponto de corte do calibrador sugerido pelo fabricante, resultando em 88% de sensibilidade e 98,7% de especificidade (IMMY™, Norman, Oklahoma, USA).
- Das 287 PVHA incluídas no estudo, a maioria era do sexo masculino e não apresentava critério clínico de gravidade (contexto ambulatorial). Nos investigados, grande parte apresentou contagens de LTCD4+  $\geq 200$  células/mm<sup>3</sup>, já dentre as PVHA com HD houve uma distribuição paritária entre  $< 50$  e  $\geq 200$  células/mm<sup>3</sup>. Variáveis como idade, uso de tratamento ARV e TB não apresentaram diferenças significativas entre PVHA investigadas e com HD.
- O uso do HGM-EIA como teste para rastreio de HD em PVHA no HU-FURG/EBSERH, demonstrou uma taxa de prevalência de 9% da doença. A incidência de HD no âmbito ambulatorial foi de 2 casos/1.000 consultas, enquanto no contexto de internações hospitalares foi de 39 casos/ 1.000 internações, resultando em uma taxa de mortalidade geral de 24% em 90 dias.
- Comparando com estudo prévio no mesmo local de estudo (Basso et al., 2022) ressalta-se que a utilização da investigação sistemática (teste de rastreio) para o diagnóstico de HD impactou no prognóstico dos pacientes pois: 1) elevou em mais de 200% a taxa de diagnósticos (de 12 para 39 casos a cada 1.000 internações); 2) reduziu em 30% a taxa de mortalidade (35% para 24%).
- Exames micológicos clássicos foram positivos em apenas 18% dos casos de HD, a partir de amostras respiratórias ou biópsia de pele. Testes de imunodifusão como esperava-se teve uma baixa sensibilidade, não detectando nenhum caso.
- O biomarcador urinário mostrou-se eficaz para confirmação da cura clínica sendo negativo após 90 dias do início do tratamento em 75% dos pacientes, e permanecendo detectável somente naqueles com má adesão ao tratamento.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo foi pioneiro na otimização do teste de biomarcador urinário, considerado padrão ouro no diagnóstico de HD, em uma cidade com alta prevalência de PVHA e endêmica para IO. E frente ao aumento na sensibilidade da interpretação do HGM-EIA pelo calibrador, a otimização foi adotada na rotina diagnóstica do Laboratório de Micologia (FAMED-FURG), contemplando a inclusão de um maior número de pacientes por kit, obtendo um melhor rendimento do método e consequente redução de custos.

A implementação do HGM-EIA na rotina diagnóstica dos centros de saúde, se faz necessária, tendo em vista sua elevada sensibilidade espera-se um aumento de diagnósticos precoces de HD em PVHA, que associado a instituição de terapia antifúngica, ainda na presença de manifestações clínicas leves, é possível a realização do tratamento por via oral, impactando tanto no desfecho clínico e na qualidade de vida da PVHA com HD, quanto na redução de custos referente a necessidade de hospitalizações para tratamento intravenoso da HD, preconizado para presença de manifestações clínicas moderadas a graves. Garantindo assim, um melhor aproveitamento do financiamento público do SUS brasileiro, beneficiando direta e indiretamente outros pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ADENIS, A. et al. HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: from neglect to priority. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e 3100, ago. 2014.
- ADENIS, A.A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **Lancet Infect Dis**, 2018 Aug 23. pii: S1473-3099(18)30354-2.
- ADENIS, A.A.; AZNAR, C.; COUPPIÉ P. Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps. **Curr Trop Med Rep**, v.1, n.2, p. 119-128, 2014.
- AIDÉ, M.A. Capítulo 4: histoplasmoze. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** [online]. 2009, v. 35, n. 11, pp. 1145-1151. <https://doi.org/10.1590/S180637132009001100013>
- ALMEIDA, L; LACAZ, C.S. Cogumelos do gênero *Histoplasma* isolados de lesões de cromomicose. Associação de fungos nas lesões. **Folia Clinica et Biologica**, v.9, p. 65-69, 1939.
- ALMEIDA, M.A. et al. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review. **Int J Infect Dis**. 2019 Sep;86:147-156. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.07.009. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31330326.
- ALMEIDA-SILVA, F. et al. Genomic Diversity Analysis Reveals a Strong Population Structure in *Histoplasma capsulatum* LAmA (*Histoplasma suramericanum*). **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 10, p. 865, 2021.
- AZAR, M.M.; HAGE, C.A. Clinical Perspectives in the Diagnosis and Management of Histoplasmosis. **Clin Chest Med**, v.38, n.3, p.403-415, 2017.
- BASSO, R; POESTER, V; BENELLI, J; et al. Disseminated Histoplasmosis in Persons with HIV/AIDS, Southern Brazil, 2010–2019. **Emerging Infectious Diseases**. 2022;28(3):721-724. DOI:10.3201/eid2803.212150
- BLAN, B. D. S. et al. Optimization of a commercial *Histoplasma* galactomannan EIA test in a population from an endemic area of histoplasmosis in southern Brazil. **Mycoses**, v. 66, n. 4, p. 304–307, 2023.
- BOIGUES, B. C. S. et al. Clinical outcomes and risk factors for death from disseminated histoplasmosis in patients with AIDS who visited a high-complexity hospital in Campo Grande, MS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 155–161, 2018.
- BRASIL. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV em Adultos e Crianças**. 4 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- BRASIL. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim epidemiológico HIV/aids**. Número especial. Brasília. Ministério da Saúde. 2023.

BUITRAGO, M.J. *et al.* Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Rev Iberoam Micol**, v.30, n.4, p.256-260, 2013.

CÁCERES, D.H. *et al.* M. Histoplasmosis y sida: Factores de riesgo clínicos y de laboratorio asociados al pronóstico de la enfermedad. **Infectio**, v.16, p.44-50, 2012.

CÁCERES, D.H. *et al.* Diagnóstico de histoplasmose disseminada progressiva em HIV avançado: uma meta-análise do desempenho analítico do ensaio. **J Fungos**, 5(3):1–13, 2019a. <https://doi.org/10.3390/jof5030076>

CÁCERES, D.H. *et al.* The Manaus Declaration: Current Situation of Histoplasmosis in the Americas, Report of the II Regional Meeting of the International Histoplasmosis Advocacy Group. **Curr Fungal Infect Rep**, v.13, p.244-249, 2019b.

CÁCERES, D.H.; VALDES, A. Histoplasmosis and Tuberculosis Co-Occurrence in People with Advanced HIV. **J Fungi**, v.5, n.3, p.1-10, 2019.

CAETANO, J.A. Machado. Aspectos imunológicos pertinentes da infecção por HIV. **Acta médica portuguesa**, [s. l.], v. 4, p. 52-58, 1991.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1987 Revision of the CDC Surveillance Case Definition for Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.36, n.1, p.1-15, 1987.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2020. **Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents.**

CORREIA, F. G. S. Análise espacial dos casos de histoplasmose disseminada associada a AIDS no município de Fortaleza. 2012. 106 f. **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)** - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

COUPPIÉ, P.C; *et al.* American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**: October 2006 - Volume 19 - Issue 5 - p 443-449.

DANTAS, K.C. *et al.* Comparison of diagnostic methods to detect *Histoplasma capsulatum* in serum and blood samples from AIDS patients. (2018) **PLoS ONE** 13(1): e0190408. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190408>

DARLING, S. T. The morphology of the parasite (*Histoplasma capsulatum*) and the lesions of histoplasmosis, a fatal disease of tropical America. **J Exped Med**, v.11, n.4, p.515-531, 1909.

DA SILVA ZATTI, M. *et al.* Amplificação isotérmica mediada por loop e PCR nested do espaçador transcrito interno (ITS) para detecção de *Histoplasma capsulatum*. **PLoS Negl Trop Dis** 13(8):1–20, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007692>

EMMONS, C. W. Association of Bats with Histoplasmosis. **Public Health Reports**, v. 73, n.7, p.590-595, 1958.

FALCI, D. R.; DALLA LANA, D. F.; PASQUALOTTO, A. C. The era of histoplasmosis in Brazilian endemic mycoses. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 3, p. 100037, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2021.100037>

FALCI, D.R. et al. Histoplasmosis, an underdiagnosed disease affecting people living with HIV/AIDS in Brazil: results of a multicenter prospective cohort study using both classical mycology tests and histoplasma urine antigen detection. **Open Forum Infect Dis**, 2019;6(4): ofz073. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz073>

FERNÁNDEZ ANDREU, C.M. et al. Una actualización acerca de histoplasmosis. **Rev Cubana Med Trop**, v.63, n.3, p.189-205, 2011.

FERNÁNDEZ ANDREU, C.M. et al. Utilización de exoantígenos para la identificación de *Histoplasma capsulatum*. **Rev Cubana Med Trop**, v.42, p.272-278, 1990.

FERREIRA, B. D. S. Histoplasmosse disseminada em pacientes com AIDS: Características clínico-epidemiológicas e análise espacial em hospital de referência de uma metrópole do centro-oeste brasileiro. 2015. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosse. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.2, p.192-198, 2009.

FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia volume 2/ Veronesi-Focaccia**. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2021.

GÓMEZ, B.L. Histoplasmosis: Epidemiology in Latin America. **Curr Fungal Infect Rep** 5, 199 (2011). <https://doi.org/10.1007/s12281-011-0073-7>

GUERRA, B.T., ALMEIDA-SILVA, F., ALMEIDA-PAES, R. et al. Histoplasmosis Outbreaks in Brazil: Lessons to Learn About Preventing exposure. **Mycopathologia** 185, 881–892 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00389-w>

GUIMARÃES, A.J.; NOSANCHUK, J.D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Diagnosis of Histoplasmosis. **Braz J Microbiol**, v.37, n.1, p.1-13, 2006.

HAGAN, T. The Discovery and Naming of Histoplasmosis: Samuel Taylor Darling. **Antimicrobe**, 2003.

HAGE, C.A. et al. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. **Semin Respir Crit Care Med**, v.36, n.5, p.729-745, 2015.

IMMY. Histoplasma Gm Enzyme Immunoassay [Bula]. Oklahoma (USA): IMMY; 2021.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis. **Clin Chest Med**. 2009 Jun;30(2):217-25, v. doi: 10.1016/j.ccm.2009.02.002.

KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v.20, n.1, p.115-132, 2007.

- LA HOZ, R. M. et al. How I treat histoplasmosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.
- LACAZ, C.S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002.
- NACHER, M. et al. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients in South America: a neglected killer continues on its rampage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 11, p. e2319, nov. 2013.
- NACHER, M. et al. The Fight against HIV-Associated Disseminated Histoplasmosis in the Americas: Unfolding the Different Stories of Four Centers. **J Fungi**, v.5, n.2, 51, 2019.
- NACHER, M. et al. Disseminated Histoplasmosis: Fighting a Neglected Killer of Patients with Advanced HIV Disease in Latin America. **PLoS Pathog** 16(5):e1008449, maio de 2020, disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008449>.
- OPAS/OMS. Organização Pan Americana Saúde e Organização Mundial da saúde. **Guidelines for Diagnosing and Managing Disseminated Histoplasmosis among People Living with HIV**. 2020
- PASQUALOTTO AC, QUIEROZ-TELLES F. Histoplasmosis dethrones tuberculosis in Latin America. **Lancet Infect Dis** 2018; 18:1058–60.
- RAPPLEYE, C.A.; EISSENBERG, L.G.; GOLDMAN, W.E. Histoplasma capsulatum alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci**, v.104, n.4, p.1366-1370, 2007.
- RIVIÈRE, S. et al. Serum Aspergillus Galactomannan for the Management of Disseminated Histoplasmosis in AIDS. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n.2, p.303–305, 2012.
- ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Histoplasmosse Clássica: **Revisão**. **RBAC**, vol. 38(4): 275-279, 2006.
- SAMAYOA, B. et al. High Mortality and Coinfection in a Prospective Cohort of Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients with Histoplasmosis in Guatemala. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97, n.1, p.42-48, 2017.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE GOIÁS. **Boletim epidemiológico do estado de goiás – 2013**. Goiânia:2013.
- SEPÚLVEDA, V.E. et al. Genome sequences reveal cryptic speciation in the human pathogen *Histoplasma capsulatum*. **mBio**, 2017. <https://doi.org/10.1128/mbio.01339-17>.
- SIDRIM, J.J.C; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos Clínicos e Laboratorias da Micologia Médica. Publicado em 1999 Edição 1 pg. 221
- SILVA, M.T.G.; SANTANA, F.F.; ARRAES, L.W.M.S.; ARRAES, L.C.M.; SILVA, M.M.M. Disseminated Histoplasmosis In Patients With Human Immunodeficiency Syndrome Acquired. **Braz. J. Hea. Rev.**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 6, 2042-2048, mar./apr. 2019.

TRAEBERT, J; et al. The burden of AIDS: a time series analysis of thirty-five years of the epidemic in Brazil. **AIDS Care** 2018; 30(11):1413–20.

WANKE, B.; LAZERA, M. Histoplasmose clássica e africana. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.22, p.222-236.

WHEAT, L. J.; SLAMA, T. G.; ZECKEL, M. L. Histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 78, n. 2, p. 203–210, fev. 1985. DOI: [10.1016/0002-9343\(85\)90427-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90427-9)

WHEAT, L.J. Diagnosis and management of histoplasmosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.8, p.480-490, 1989.

WHEAT, L. J. Nonculture Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections. **Curr Infect Dis Rep**, v.9, n.6, p. 465-471, 2007.

WHEAT, L.J. et al. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin N Am**, v. 30, n. 1, p. 207–227, 2016.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Second WHO Model List of Essential In Vitro Diagnostics**. 2019. p.36.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v.6, p.327-331, 2003.

XAVIER, M.O. et al. Cross-Reactivity of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus* Species in the Commercial Platelia *Aspergillus* Enzyme Immunoassay. **Clinical Laboratory Immunology**. v.16, n.1, p. 132-133, 2009.

## ANEXO A



HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DR. MIGUEL RIET CORRÊA JR. DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

Rua Visconde de Paranaguá, nº 102 - Bairro Centro  
Rio Grande-RS, CEP 96200-190  
- <http://hu-furg.ebserh.gov.br>

**Carta - SEI nº 28/2022/SGPITS/GEP/HU-FURG-EBSEH**

Rio Grande, 01/06/2022.

## CARTA DE ANUÊNCIA

1. Informo para os devidos fins e efeitos legais, objetivando atender as exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, estar ciente do projeto de pesquisa: **“AVALIAÇÃO DA SISTEMATIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE HISTOPLASMOSE EM UM HOSPITAL REFERÊNCIA NO TRATAMENTO DE HIV E SUA RELAÇÃO COM DESFECHO CLÍNICO”**, sob a responsabilidade do Pesquisador Principal **BIANCA DOS SANTOS BLAN**.

2. Declaro ainda conhecer e cumprir as orientações e determinações fixadas na Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde e demais legislações complementares.

No caso do não cumprimento, por parte do pesquisador, das determinações éticas e legais, a Gerência de Ensino e Pesquisa tem a liberdade de retirar a anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.

4. Informo que o presente projeto foi aprovado pela Unidade de Doenças Infecciosas e Parasitárias e o Setor de Apoio Diagnóstico e Terapêutico.

5. Considerando que esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos propostos mediante a plena aprovação do CEP competente.

*(assinada eletronicamente)*

Gestão da Pesquisa e Inovação Tecnológica em Saúde



Documento assinado eletronicamente por **Luis Fernando Guerreiro, Chefe de Setor**, em 01/06/2022, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da sistematização do diagnóstico de histoplasmose em um Hospital referência no tratamento de HIV e sua relação com desfecho clínico

**Pesquisador:** Melissa Orzechowski Xavier

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 59129722.6.0000.5324

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande - FURG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER Número

**do Parecer:** 5.578.347

### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo de Informações Básicas do Projeto n.º 1956423, gerado pelo preenchimento dos campos de submissão da plataforma Brasil em 10/08/2022, e/ou do Projeto Detalhado.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) infecta o hospedeiro fazendo com que este progressivamente perca sua capacidade efetiva de defesa deixando o organismo vulnerável a doenças. Como resultado, pode surgir a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que é definida pelo aparecimento de neoplasias e/ou infecções oportunistas (IO) como criptococose, tuberculose, histoplasmose e outras. A histoplasmose é resultante da infecção por *Histoplasma capsulatum* a partir da inalação de seus conídios presentes no ambiente, em especial em solo contaminado com fezes de morcegos e aves. A histoplasmose disseminada (HD) está relacionada à imunodepressão do indivíduo, sendo uma doença definidora de aids e uma das principais doenças oportunistas em pessoas com HIV em áreas endêmicas responsável pela alta mortalidade. Embora seja uma IO comum em pessoas com aids, trata-se de uma doença negligenciada e comumente confundida com a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, esse estudo busca avaliar o impacto da implementação sistemática do teste padrão-ouro para diagnóstico da HD em pessoas vivendo com infecção pelo HIV. Trata-se de um estudo descritivo, exploratório de caráter

Continuação do Parecer: 5.578.347

quantitativo que apresenta duas etapas de execução. A primeira caracteriza-se por um estudo retrospectivo com pesquisa documental de prontuários incluindo dados de pacientes atendidos no período de março de 2021 a março de 2022. Na segunda etapa, será realizado um levantamento de campo para avaliação clínica do desfecho dos pacientes incluídos na pesquisa. O estudo acontecerá no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. HU-FURG. A análise será por testes



estatísticos utilizando o programa SPSS24.0 (IBM® SPSS Statistics), sendo considerados valores de p0,05 significativos. Todos os aspectos éticos serão respeitados.

### **Objetivo da Pesquisa:**

#### Objetivo Primário:

Avaliar o impacto da implementação sistemática do teste padrão-ouro na epidemiologia, na precocidade diagnóstica e no prognóstico da histoplasmose disseminada (HD) em pessoas vivendo com infecção pelo HIV (PLHIV) em um hospital terciário do Extremo Sul do Brasil.

#### Objetivo Secundário:

- Determinar o perfil clínico-epidemiológico da população de estudo e dados ecológicos de exposição a fontes de infecção;
- Avaliar a taxa de incidência e a taxa de mortalidade da histoplasmose disseminada em PLHIV em um hospital terciário do Sul do Brasil;
- Correlacionar os dados de incidência com os dados de investigação da doença;
- Avaliar a terapia antifúngica utilizada e o desfecho em 90 dias do diagnóstico de HD;
- Comparar a frequência e o desfecho associadas a HD entre o período pré e pós-implementação sistemática da detecção de biomarcador em todos PLHIV atendidos na mesma instituição;
- Avaliar a detecção do biomarcador e de anticorpos específicos após 90 dias do início da terapia antifúngica e correlacionar com o progresso terapêutico.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

#### Riscos:

Levando em conta que a pesquisa busca em uma de suas etapas a avaliação clínica e coleta de amostras laboratoriais, os participantes estão expostos à riscos de natureza física e/ou emocional, na ocorrência desses abalos os pesquisadores garantem aos participantes uma assistência imediata, integral e gratuita. Assegura-se a garantia de indenização aos participantes diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa nos termos da lei. Ressaltando que os participantes, conforme consta no TCLE, poderão abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem que isto lhes acarrete prejuízos de qualquer natureza.

**Endereço:** Av. Itália, km 8, segundo andar do prédio das PRÓ-REITORIAS, Rio Grande, RS, Brasil. **Bairro:** Campus Carreiros **CEP:** 96.203-900

**UF:** RS **Município:** RIO GRANDE

**Telefone:** (53)3237-3013

**E-mail:** [cep@furg.br](mailto:cep@furg.br)

Continuação do Parecer: 5.578.347

#### Benefícios:

O estudo busca promover benefícios aos participantes por meio de uma consulta de enfermagem individualizada esclarecendo dúvidas e questionamentos, além dos benefícios que advirão com a realização da pesquisa quanto a identificação de aspectos referentes ao ambiente e possíveis fontes de infecção por *histoplasma spp.*, manifestações clínicas encontradas na população atendida, demonstração de possíveis impactos positivos após a implementação sistemática do teste padrão-ouro na investigação, no diagnóstico e prognóstico da histoplasmose disseminada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** Estudo nacional, unicêntrico. Caráter acadêmico. Número de participantes previsto: 376

Data de início: 30/5/2022

Data de fim: 1/12/2023

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

8. Solicita-se que se descreva a segurança e monitoramento dos dados. Apresentando local físico institucional, tempo (mínimo de cinco anos) e nome do responsável pela guarda de todos os materiais (impressos e digitais) gerados pela pesquisa.

ANÁLISE: ATENDIDA PARCIALMENTE. Indicar o local e a instituição da sala de permanência da pesquisadora responsável.

Local de arquivamento inserido ao projeto na Página 10 no seguinte trecho:

“Declara-se que os dados (informações de prontuários, dados cadastrais e consentimentos) e materiais coletados durante a pesquisa ficarão sob a confiança da pesquisadora responsável Melissa Orzechowski Xavier em sua sala de permanência na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande, no Campus da Saúde - Área Acadêmica Profº Newton Azevedo (Rua Visconde de Paranaguá, 102, sala 302 B. CEP 96203-900).”

ANÁLISE: ATENDIDA.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da

**Endereço:** Av. Itália, km 8, segundo andar do prédio das PRÓ-REITORIAS, Rio Grande, RS, Brasil. **Bairro:** Campus Carreiros **CEP:** 96.203-900  
**UF:** RS **Município:** RIO GRANDE **E-mail:** [cep@furg.br](mailto:cep@furg.br)  
**Telefone:** (53)3237-3013

--



Continuação do Parecer: 5.578.347

pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme Resolução CNS 466/12 item XI.2.d. e Resolução CNS 510/16 Art. 28.V.

O modelo encontra-se disponível no site do CEP-FURG (<https://propesp.furg.br/pt/comites/cep-furg>) e o seu prazo é de 40 dias após a data final do cronograma.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1956423.pdf	10/08/2022 12:38:35		Aceito
Outros	carta_resposta3.pdf	10/08/2022 12:37:42	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_DETALHADO.pdf	10/08/2022 12:36:56	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	09/08/2022 09:46:55	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_anuencia.pdf	26/07/2022 10:56:05	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	30/05/2022 12:34:53	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito
Folha de Rosto	20220530101914244.pdf	30/05/2022 12:33:36	Melissa Orzechowski Xavier	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não

**Endereço:** Av. Itália, km 8, segundo andar do prédio das PRÓ-REITORIAS, Rio Grande, RS, Brasil. **Bairro:** Campus Carreiros **CEP:** 96.203-900

**UF:** RS **Município:** RIO GRANDE

**Telefone:** (53)3237-3013

**E-mail:** [cep@furg.br](mailto:cep@furg.br)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE - FURG



Continuação do Parecer: 5.578.347

RIO GRANDE, 12 de Agosto de 2022

---

**Assinado por:**  
**Camila Daiane Silva**  
**Coordenador(a)**